

ARQUIVOS
DO INSTITUTO
NACIONAL
DE SAÚDE



VOL. XX-XXI | 1994/95

ARQUIVOS DO INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE



VOL. XX-XXI | 1994/95

ARQUIVOS
DO
INSTITUTO
NACIONAL DE
SAÚDE

DIRECTOR

José Luís Castanheira

CONSELHO CIENTÍFICO

*Maria de Fátima Alpendurada
António Amorim
Francisco Antunes
Luís Archer
Henrique Barros
Mário Bernardo
Victor Manuel Pais Caeiro
Joaquim António Machado Caetano
José Manuel Calheiros
Salvador Massano Cardoso
Germano do Carmo
Sérgio Castedo
Hugo David
António Lobato de Faria
Mário Faria
Wanda Canas Ferreira
Maria Odette Santos Ferreira
Jorge Torgal Garcia
Aires Humberto da Penha Gonçalves
Manuel Júdice Halpern
Benvindo Justiça
Henrique Lecour
José Manuel Sousa Lobo
Ana Costa Miranda
Carolino Monteiro
José Augusto Guimarães Moraes
José Moniz Pereira
Augusto Franco Pinheiro Pinto
António Mário Rodrigues Ribeiro
Manuel Santos Rosa
José Rueff
Maria Helena Saldanha
Heloísa Santos
Paula Marreilha dos Santos
Maria João Saraiva
Carlos Silveira
Luís Gonçalves Sobrinho
João Carlos Figueiredo Sousa
Frederico José Teixeira
Jaime Santos Dias Travassos*

CONSELHO REDACTORIAL

*Maria dos Anjos Catry
Maria José Vaz Dias
João Lavinha
Ilda Martins
Teresa Paixão
Maria Odete Rodrigues*

SECRETARIADO

*Cristina Lopes
Rui A. F. Rodrigues*

REDACÇÃO, ADMINISTRAÇÃO E PROPRIEDADE

*INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE
DR. RICARDO JORGE
Av. Padre Cruz
1699 Lisboa Codex
PORTUGAL*

COMPOSIÇÃO E IMPRESSÃO

*Gráfica 2000
Rua Sacadura Cabral, 89-A
1495 CRUZ QUEBRADA*

VOL. 20-21 1994/95

O Instituto Nacional de Saúde não se responsabiliza pelas opiniões expressas nos artigos publicados nos ARQUIVOS, que são da exclusiva responsabilidade dos seus Autores. A utilização destes trabalhos obriga à identificação da sua origem e autoria.

DEPÓSITO LEGAL N.º 13502/86
ISSN 0870 - 2845

© Instituto Nacional de Saúde, 1997

18 NOV. 1997

Sumário / Contents

1. O que deveria ser melhorado nos serviços públicos de saúde?. Estudo de opinião, de base populacional, na Freguesia do Lumiar (Lisboa)	5
What should be improved in the Portuguese public health services?. A population-based opinion study in the Lumiar quarters of Lisbon	
Vítor Ramos	
2. Dados preliminares para o estudo da morbilidade em psicogeriatría	15
Preliminary data for the study of morbidity in geriatric psychiatry	
Olívía Robusto Leitão	
3. Some aspects of cellular immune response to recombinant hepatitis B surface antigen in haemodialysed chronic carriers of hepatitis B virus	23
Alguns aspectos da resposta imunológica celular ao antígeno recombinante de superfície viral em hemodialisados portadores crónicos do vírus da hepatite B.	
Albertina M. Freitas; Artur A. Paiva; Ana M. C. Silva; José M. C. Gomes; Henriqueta Brêda Coimbra	
4. Espondilodiscite brucélica seronegativa	29
Seronegative brucellic spondylodiscitis	
Graça Amaro; Manuela Grego; M. Cristina Esteves	
5. Geografia genética e prevenção da fibrose quística em Portugal	35
Gene geography and prevention of cystic fibrosis in Portugal	
Pedro Loureiro; Paula Pacheco; Ângela Duarte; Cristina Albuquerque; João Lavinha	
6. Determinação de <i>Listeria sp</i> em queijos de pasta mole de produção nacional: comparação de métodos	43
Detection of <i>Listeria sp</i> in soft cheese: evaluation of three different methods	
Maria Isabel Santos; Cristina Belo Correia; Maria do Rosário Novais; Paulo Jorge Nogueira	
7. Ocorrência de <i>Listeria spp.</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> em pescado fumado a frio em Portugal	55
Occurrence of <i>Listeria spp.</i> in Portuguese cold-smoked fish products	
Gabriela Duarte; Manuela Vaz Velho; Paul Gibbs	
8. Longevidade e senescência do eritrócito humano	63
Human erythrocyte life span and ageing	
Alice Santos Silva; Elisabeth M. B. Castro; Alexandre Quintanilha	
9. O clima interior dos Hospitais da Universidade de Coimbra: resultados do «Örebro questionnaire»	81
Coimbra University Teaching Hospitals (HUC) indoor environment: results from the «Örebro questionnaire»	
J. J. Amaral-Mendes; K. Andersson; Otávio Lopes; Ivone Teles	
Bibliografia publicada noutros periódicos, por investigadores e técnicos do INSA	103
Papers published by INSA staff in other scientific journals	
Normas para a preparação de manuscritos	109
Instructions for authors	

O que deveria ser melhorado nos serviços públicos de saúde?

– Estudo de opinião, de base populacional, na Freguesia do Lumiar (Lisboa)*

Vítor Ramos**

RESUMO

Objectivos: a) caracterizar os respondentes por sexo, idade, escolaridade, profissão/ocupação; b) identificar a cobertura assistencial dos inquiridos (SNS e subsistemas); c) descrever, sistematizar e analisar as opiniões dos inquiridos, por sexo e idade, sobre o que deveria ser melhorado nos serviços públicos de saúde.

Tipo de estudo: Estudo de opinião, de base populacional, com análises internas (comparações entre grupos).

Local: Freguesia do Lumiar, em Lisboa.

População: O universo foi constituído pelos residentes adultos da freguesia do Lumiar, tendo sido colhida uma amostra aleatória de 886 pessoas, utilizando os números de recenseamento eleitoral.

Métodos: Foram consideradas as variáveis: *sexo, idade, escolaridade, ocupação, subsistemas de cobertura assistencial e conteúdo das respostas a uma pergunta aberta* sobre o que deveria ser melhorado nos serviços públicos de saúde. A recolha de dados foi feita com um Questionário preparado para auto-administração, proporcionando-se a ajuda de entrevistas sempre que necessário. Foi feita análise descritiva univariada e também bivariada para comparações entre grupos e teste de hipóteses, tendo sido considerada uma significância estatística ao nível de 5% ($P < 0,05$). A análise estatística quantitativa foi feita utilizando o Programa SPSS/PC+. Foi ainda feita análise qualitativa do conteúdo das respostas à pergunta aberta.

Resultados: A taxa de respondentes foi de 72%, sendo mais elevada no sexo feminino (75%) e no grupo etário dos idosos (85%). 57% dos respondentes dispunham de subsistemas assistenciais, além do SNS. 80% dos inquiridos deram respostas concretas à pergunta aberta sobre o que deveria ser melhorado nos serviços públicos de saúde. Os aspectos relacionados com a *acessibilidade* e com as *atitudes dos profissionais para com os utentes* foram os mais mencionados (47 e 41%), seguindo-se-lhe os aspectos relacionados com *infra-estruturas, recursos e humanização organizativa* dos serviços (35 e 30%). Encontraram-se diferenças estatisticamente significativas em relação às frequências com que alguns aspectos foram mencionados pelas pessoas dos diferentes grupos etários, o mesmo não acontecendo em relação ao sexo.

Discussão: A interpretação dos resultados deve ter em conta as características específicas da população inquirida. As taxas de respondentes nas diferentes idades traduzem a sua disponibilidade o que justifica a elevada participação obtida entre os idosos. O número de pessoas que mencionou determinado aspecto a melhorar corresponde apenas àquelas a quem ocorreu falar dele, no momento da entrevista. Em conclusão: a) mais de metade dos respondentes dispunha de um ou mais subsistemas assistenciais em sobreposição ao SNS; b) a *acessibilidade* e as *atitudes dos profissionais* foram os mais repetidamente mencionados; c) encontrou-se uma relativa unanimidade em relação aos aspectos a melhorar, embora os idosos pareçam ser, em geral, menos exigentes; d) existem diferenças geracionais nas frequências com que os diversos aspectos a melhorar foram mencionados.

Palavras-chave: Serviços públicos de saúde; expectativas dos utentes; opinião do público.

SUMMARY

Objectives: a) to study some demographic and socio-economic characteristics of the respondents; b) to identify their health insurance systems and sub-systems; c) to describe and to systematise their opinions on what should be improved in the Portuguese public health services.

Study design and local: population-based opinion study in the Lumiar quarters of Lisbon.

Population: A random sample of 886 people was inquired among the residents in the Lumiar quarters.

Methods: The variables were: gender, age, literacy, occupational status, health insurance sub-systems, content of the answer to an open question on *what should be improved in the public health care services*. Data was collected with a self-administered questionnaire. The possibility of the help of an interviewer was offered to the respondents. Statistical descriptive univariate analysis as well as comparisons between groups were performed using the computer programme SPSS/PC+. A qualitative analysis was done of the content to the open question.

* Trabalho subsidiado pela Comissão de Fomento da Investigação em Cuidados de Saúde do Ministério da Saúde (Projecto de Investigação n.º 125/92)

** Assistente Graduado de Clínica Geral; Assistente da Escola Nacional de Saúde Pública

Results: Respondent ratio was 72%. The elderly had the highest rates (85%) and the males 18-44 years had the lowest rates (50 and 63%). 57% of the respondents had one or more health care sub-systems or health insurance apart the universal National Health Service (NHS). 80% of the people gave concrete answers to the open question with comments and suggestions. *Accessibility* and the *attitudes of the health care professionals towards patients* were the most frequently approached subjects for urgent improvement. *Facilities and equipment, human resources and organisational humanisation* were also frequently mentioned. Differences with statistical significance were found with age but not with the gender. Elderly people seemed to be less exigent than the other age groups, except for the aspects related to costs.

Discussion and conclusions: Interpretation of the results must take into account the socio-economic characteristics of the residents in the Lumiar quarters of Lisbon. Different respondent rates may be related to the available time of people in the different phases of life (age groups). This could have some quantitative influence on the results. The additional health care coverage, apart the universal NHS, in more than half of the respondents may mean waste of resources in global societal terms. The quantitative differences found between age groups can be explained by the relative importance that each generation gives to each particular aspect. The elderly seem to be the less exigent group, except in relation to costs. *Accessibility* to public health care and the *attitudes of the health care professionals towards patients* appear notably as universally perceived aspects for urgent improvement.

Keywords: Health care services; public expectations; public opinion.

Introdução

Nos últimos 10 anos tem-se assistido a uma vaga de reformas em quase todos os sistemas de saúde dos países industrializados¹⁻⁷. Os objectivos anunciados destas reformas incluem, entre outros:

- a procura de uma maior *adequação* aos problemas e necessidades de saúde das populações;
- a obtenção de mais *satisfação* dos utilizadores, adoptando «estratégias centradas no cliente» e procurando ir ao encontro das suas expectativas.

A expressão «marketing social» tem sido utilizada para designar o processo organizado e sistemático para corresponder às necessidades, preferências e expectativas dos cidadãos, no domínio dos sectores sociais, nomeadamente o da saúde^{8,9}. Algumas das reformas em curso têm sido acompanhadas de estudos de opinião¹⁰⁻¹².

A realização de estudos de opinião para melhorar os serviços de saúde não é uma prática muito usual no nosso país. Estes estudos podem considerar-se instrumentos importantes para facilitar a participação dos cidadãos e para aproximar os serviços de saúde das suas expectativas.

O presente estudo integrou-se num projecto de investigação de base populacional, realizado na Freguesia do Lumiar, em Lisboa, sobre a percepção de problemas e de necessidades de saúde, a utilização de cuidados, bem como as preferências, expectativas e opiniões dos cidadãos face aos serviços de saúde.

Este estudo diz especificamente respeito à opinião dos cidadãos da Freguesia do Lumiar sobre o que deveria ser melhorado nos serviços públicos de saúde e os seus objectivos foram:

- a) caracterizar os respondentes por idade, sexo, níveis de escolaridade e profissão/ocupação;
- b) identificar os subsistemas (além do SNS) através dos quais os residentes podem ter acesso a cuidados de saúde ou ao seu financiamento;
- c) descrever e sistematizar as opiniões dos respondentes sobre o que deveria ser melhorado nos serviços públicos de saúde;
- d) estudar eventuais diferenças de opinião consoante o sexo ou idade dos inquiridos.

Métodos

Tipo de estudo

Foi realizado um estudo de opinião de base populacional, com análises internas (comparações entre grupos).

População e amostra

O universo foi constituído pelos residentes na freguesia do Lumiar inscritos no recenseamento eleitoral (todos os cidadãos maiores de 18 anos), totalizando 36 121 pessoas representadas no ficheiro da Junta de Freguesia.

Deste universo foram extraídos aleatoriamente 1240 números do ficheiro de recenseamento, com vista a obter uma amostra aleatória da população adulta residente entre 800 e 1000 pessoas. Esta diferença teve em conta a desactualização prevista do ficheiro de recenseamento (óbitos, mudanças de residência, etc.). Tal como previsto, nem todos os números correspondiam a pessoas actualmente residentes na freguesia. Das 1240 cartas enviadas com convites de participação no estudo foram recebidas

devoluções ou informação de não residência ou falecimento em relação a 354 pessoas. Foi apurada, após esta correcção, uma amostra aleatória de 886 potenciais respondentes.

Variáveis

Foram consideradas as seguintes variáveis e respectivas operacionalizações:

- *Sexo* (feminino ou masculino);
- *Idade*, em anos (foram constituídos os grupos: 18-24; 25-44; 45-64; ≥65);
- *Escolaridade* (analfabeto, sabe ler e escrever, escolaridade básica, ensino secundário – 2 níveis; curso médio e curso superior);
- *Situação de trabalho* (activos com profissão; desempregados; donas de casa; estudantes; reformados; outra situação);
- *Profissão/ocupação* (pergunta aberta);
- *Subsistemas de acesso e/ou financiamento de cuidados de saúde* (só SNS; SNS + combinações diversas com subsistemas; não sabe);
- *Categorias de conteúdo das respostas* – resultantes da análise de conteúdo das respostas à pergunta aberta: «*Em sua opinião, o que acha que deveria ser melhorado nos serviços de saúde do Estado*»:

Categorias de conteúdo consideradas:

- * *Aspectos relacionados com a estrutura e recursos*
- * *Aspectos relacionados com custos e taxas*
- * *Aspectos relacionados com a acessibilidade aos cuidados de saúde*
- * *Aspectos relacionados com as atitudes dos profissionais para com os utentes/doentes*
- * *Aspectos relacionados com a humanização organizativa dos serviços*
- * *Aspectos relacionados com a competência técnico-científica dos profissionais*
- * *Aspectos relacionados com a burocracia dos serviços*
- * *Aspectos relacionados com a informação, a educação para a saúde e a prevenção*
- * *Outros aspectos*

Em relação a cada categoria de conteúdo ou tipo de aspectos mencionados as possibilidades de codificação desta última variável foram: *mencionou; não mencionou.*

Recolha de dados

A recolha de dados decorreu de Julho de 1993 a Março de 1994 e foi feita com base num Questionário preparado para auto-administração. Foi oferecida a ajuda de entrevistadores (os dois investigadores e duas colaboradoras devidamente treinadas), sempre que solicitada pelos entrevistados. Foram enviados convites por carta para entrevistas na Junta de Freguesia ou no Centro de Saúde do Lumiar. Foi proposta a possibilidade de a entrevista decorrer no domicílio ou noutra dia e hora que fosse mais conveniente. Após um primeiro convite por carta personalizada e uma primeira série de entrevistas, foi feito um segundo convite para os que não haviam comparecido e foi feito um esforço adicional de contacto pessoal telefónico a fim de obter o máximo de respondentes. Nesta fase foi aberta a possibilidade de retorno dos questionários por correio (envelope selado) às pessoas que o desejassem, uma vez que ao longo dos contactos e entrevistas havidos se verificou que a maioria das pessoas conseguia responder ao Questionário sem necessidade de ajuda.

Quer a página de rosto do Questionário quer a explicação dada pelos entrevistadores informavam os fins estritamente técnico-científicos do estudo, visando a melhoria da qualidade dos cuidados de saúde. A identidade de cada respondente ficou em sigilo absoluto e o questionário foi construído de forma a dar esta garantia. Foi explicado aos participantes como era garantida a confidencialidade e que poderiam não responder a qualquer das perguntas, se assim o entendessem. Foi assegurado que os dados obtidos seriam trabalhados no seu conjunto e nunca analisados individualmente.

Tratamento e análise de dados

Os dados e a informação das respostas, a maioria das quais estava pré-codificada, foram transferidas dos questionários para uma matriz, tendo-se constituído uma base de dados informatizada em DBASE III Plus.

O tratamento estatístico foi feito com recurso ao programa «Statistical Package for Social Sciences» (SPSS PC+)¹³. Procedeu-se a uma análise descritiva univariada com elaboração de tabelas de frequência para todas as variáveis. Foi também realizada análise bivariada com recurso a tabelas de duas entradas para comparar as respostas do sexo feminino e do sexo masculino bem como nos diferentes grupos etários.

Foi feita *análise de conteúdo* da pergunta aberta de opinião, em quatro etapas:

1. leitura prévia de todas as respostas, com uma 1.ª tentativa de as associar a grandes temas ou assuntos gerais relacionados com os serviços de saúde;
2. listagem do conjunto de temas identificados;
3. teste da lista de temas individualizados por dois observadores diferentes, para verificar se eram adequados e integravam a grande maioria das respostas. Após este processo foram seleccionados os 9 grupos descritos no item «*variáveis*» como «*categorias de conteúdo das respostas*»;
4. leitura e análise de todas as respostas enquadrando-as nos grupos considerados.

Nas análises quantitativas foi considerada uma significância estatística ao nível de 5% ($P < 0,05$).

Resultados

Das 886 pessoas que se supõe terem efectivamente recebido os convites de participação obteve-se a colaboração de 635 (72%). Apenas se registou recusa expressa de colaboração por parte de 21 pessoas (3,3%).

Dos 635 respondentes, 58% eram do sexo feminino e 42% do sexo masculino. 54 tinham menos de 25 anos, 222 tinham entre 25 e 44 anos, 246 tinham entre 45 e 64 anos e 112 eram pessoas com 65 e mais anos (Quadro I). A comparação com a distribuição inicial da amostra aleatória evidencia uma maior taxa de respondentes no sexo feminino (75%) e no grupo etário dos idosos (84 e 87%). A menor taxa de respondentes (50%) verificou-se no grupo etário 18-24 anos, no sexo masculino (Quadro II).

Em relação à escolaridade (Quadro III) destaca-se a proporção de respondentes com curso superior (27%). 12% dos inquiridos eram totalmente analfabetos (7%) ou não tinham concluído a escolaridade básica (5%).

A situação profissional e as profissões ou ocupações estão apresentadas nos Quadros IV e V. 57% eram pessoas no activo com profissão definida, 5% estavam desempregados e 22% eram reformados. O Quadro V ilustra a diversidade de profissões representadas, desde operários indiferenciados a professores universitários. Predominam as profissões relacionadas com o comércio e serviços, havendo uma proporção relativamente elevada de profissões consideradas «liberais» e de quadros técnicos superiores (cerca de 25%).

Em relação aos sistemas ou subsistemas de saúde é de salientar que apenas 43% dos inquiri-

dos dispunham unicamente da cobertura assistencial do Serviço Nacional de Saúde. 43% dispunham de um subsistema ou seguro adicional e 14% dispunham de dois ou mais subsistemas em simultâneo (Quadro VI).

80% dos inquiridos deram respostas concretas à pergunta aberta sobre o que deveria ser melhorado nos serviços públicos de saúde. Respostas lacónicas do tipo «está tudo bem» ou «está tudo mal» foram dadas em apenas 8% dos casos e 12% não responderam (Quadro VII).

Os aspectos relacionados com a *acessibilidade* e com as *atitudes dos profissionais* para com os utentes/doentes destacam-se nos dois primeiros lugares, tendo sido referidos por 47% e 41% dos inquiridos. Seguem-se-lhes os aspectos relacionados com *infra-estruturas, equipamentos e recursos* (35%) e com a *humanização organizativa dos serviços* (30%). Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre o sexo feminino e o masculino em relação à frequência com que foram mencionados os diversos tipos de aspectos, embora pareça esboçar-se uma maior preocupação do sexo masculino com aspectos de humanização organizativa (tempos e esperas, por exemplo) e burocracia (Quadro VIII).

Encontraram-se diferenças estatisticamente significativas entre diferentes grupos etários em relação às frequências com que foram referidos aspectos relacionados com as *infra-estruturas e recursos, humanização dos serviços e burocracia*. O grupo etário dos 25 aos 44 anos destaca-se como o mais crítico e exigente em relação a aspectos como as *infra-estruturas e recursos* e a *humanização organizativa dos serviços*. Os idosos não pareceram preocupados com a *burocracia dos serviços*. Apenas 1 em 88 mencionou este aspecto. Embora nem todas as diferenças sejam estatisticamente significativas, os idosos mostraram-se, em geral, menos críticos e exigentes que os restantes grupos etários, à excepção dos aspectos relacionados com *custos e taxas* (Quadro IX).

Aspectos relacionados com estrutura e recursos

Os aspectos relacionados com *infra-estruturas e recursos* ocorreram espontaneamente a 192 pessoas (34,5%).

As respostas mais repetidas foram:

- melhorar as condições das instalações
- mais equipamento e/ou equipamento mais adequado

- mais médicos
- reforçar e melhorar os recursos/potencial humanos
- mais higiene e segurança nos hospitais e centros de saúde
- melhores condições de trabalho
- mais centros de saúde
- melhor organização e gestão
- mais enfermeiros

Alguns comentários bastante repetidos referiam-se a aspectos muito específicos do Centro de Saúde do Lumiar, tais como:

- haver oftalmologistas e dentistas no Centro de Saúde
- haver/concentrar mais recursos, exames complementares de diagnóstico e consultas no Centro de Saúde
- haver mais médicos de ginecologia, dermatologia e pediatria no Centro

Outros comentários incidiram nos hospitais ou na interligação entre estes e os centros de saúde:

- rede mais alargada de hospitais
- melhorar a articulação entre centros de saúde e os hospitais
- melhores condições de internamento
- melhorar capacidade dos serviços de urgência

Aspectos relacionados com custos e taxas

Os aspectos económicos foram espontaneamente mencionados por 133 pessoas (24%). Os tipos de respostas mais frequentes foram:

- os medicamentos deveriam ser mais baratos
- deveria haver maior comparticipação do Estado nos custos dos medicamentos e exames complementares de diagnóstico
- mais dinheiro para os serviços de saúde
- abolir ou reduzir as taxas moderadoras

Aspectos relacionados com a acessibilidade

Os problemas de acessibilidade foram os que mereceram comentários mais numerosos e imediatos dos inquiridos. Foram espontaneamente referidos por 260 pessoas (47%) através de respostas tais como:

- mais facilidade em obter consultas

- atendimento pronto quando é necessário
- menos tempo de espera para consultas de especialidade
- mais facilidade em obter exames complementares de diagnóstico e/ou tratamentos
- não esperar tanto tempo para operações

Algumas respostas referiram-se a aspectos organizacionais concretos como, por exemplo:

- não devia haver limitação de acesso aos hospitais por área de residência/possibilidade de escolha de hospital
- o CATUS deveria estar aberto 24 horas

As consultas no domicílio foram expressamente abordadas por diversas pessoas, uma das quais sublinhou «chego a ir de rastos ao Centro de Saúde». As respostas sublinhavam em geral que deveriam ser mais fácil obter consultas no domicílio.

Aspectos relacionados com a humanização organizativa dos serviços

Os aspectos relacionados com a humanização organizativa dos serviços foram mencionados por 165 pessoas (30%). Referiram-se tanto a aspectos de estrutura física dos serviços como às regras e ambiente do seu funcionamento. As respostas mais repetidas foram:

- diminuir o tempo de espera nas salas de espera
- cumprimento de horários, evitando esperas desnecessárias e aglomeração de pessoas
- atendimento mais rápido e humanizado nos hospitais (sem macas nos corredores)
- atendimento mais organizado, personalizado e rápido
- menos espera nas urgências dos hospitais
- mais humanização/personalização no CATUS
- liberdade de se poder escolher e de mudar de médico
- não ser necessário haver «bichas»
- ser atendido sempre pelo mesmo médico
- os doentes deveriam poder ser acompanhados nas urgências
- horários de consulta mais diversificados para não ter de faltar ao emprego
- ter facilidade em marcar consultas pelo telefone
- poder contactar o médico pelo telefone

Aspectos relacionados com a burocracia

A questão da desburocratização ocorreu a 60 pessoas (11%). As respostas mais ou menos uniformes, diziam respeito à necessidade de reduzir e simplificar os procedimentos burocráticos no SNS.

Aspectos relacionados com as atitudes dos profissionais para com os utentes/doentes

Os aspectos relacionados com as atitudes dos profissionais foram, a seguir à *acessibilidade*, os referidos por mais pessoas (260=41% dos respondentes). As respostas ilustram os desejos e expectativas dos utentes neste domínio, sendo as mais repetidas:

- atendimento pelos profissionais com mais educação/respeito pela pessoa humana
- aumentar o profissionalismo de alguns médicos/enfermeiros no respeitante ao relacionamento humano
- o médico de família deve ter mais disponibilidade
- formação/educação do pessoal para o atendimento correcto e atencioso dos utentes

Aspectos relacionados com a competência técnico-científica dos profissionais

A qualidade e competência técnico-científica dos profissionais foi mencionada por 18% dos inquiridos. As respostas foram, em geral, bastante simples:

- mais competência técnico/profissional
- melhor assistência
- mais responsabilização dos médicos pelos erros cometidos
- mais cuidado na observação clínica dos doentes
- melhorar os cuidados de enfermagem

Aspectos relacionados com a informação, a educação para a saúde e a prevenção

As respostas que mencionaram a importância que deveria ser dada à informação dos utentes, à educação para a saúde e à prevenção apesar de não serem muito frequentes, ocorreram de imediato a alguns dos inquiridos (11%). Incidiram sobre:

- mais informação/educação sobre a utilização dos serviços de saúde
- mais prevenção (incluindo aspectos ambientais)
- mais educação para a saúde (vários aspectos)
- mais informação sobre os direitos dos utentes

Outros aspectos

Surgiram ainda, embora com pouca frequência, respostas sobre outros aspectos, nomeadamente sobre a necessidade de tomar medidas ou criar um sistema para atender e defender activamente os interesses dos utentes.

Discussão

A recolha de opiniões sobre os serviços públicos de saúde através de abordagens populacionais oferece várias vantagens em relação aos inquéritos aos utilizadores dos serviços, sobretudo se tais inquéritos decorrerem no momento da utilização^{10,14,15}. Mesmo assim, o facto de parte das entrevistas ter decorrido nas instalações do Centro de Saúde do Lumiar e de os entrevistadores serem profissionais do Centro de Saúde pode ter influenciado o tipo das respostas.

O nível de participação obtido (72%), em relação à amostra aleatória recolhida, pode considerar-se satisfatório, tendo em conta outros estudos deste tipo^{14,15}. Deve no entanto ser tido em conta que os grupos sociais mais marginalizados e o grupo dos cidadãos mais ocupados ou activos (em geral adultos jovens do sexo masculino) poderão estar sub-representados em relação à sua dimensão real na população residente na freguesia. Este facto pode ter influenciado os resultados obtidos dado ter-se encontrado associação estatisticamente significativa entre a idade e as frequências dos grupos de conteúdo das resposta à pergunta aberta. No entanto, a análise desagregada por grupo etário permitiu controlar o efeito da sub-representação de alguns grupos e concluir que uma maior taxa de respondentes nos grupos mais deficitários (sexo masculino 18-44 anos) apenas iria reforçar as posições relativas dos diversos aspectos mencionados.

As opiniões recolhidas dizem respeito apenas à população residente na Freguesia do Lumiar e, em princípio, não são extrapoláveis para outras zonas ou para a própria cidade de Lisboa. Porém, muitas

das opiniões devem reflectir a opinião e o sentir de uma larga camada da população em relação aos serviços públicos de saúde.

As características socioeconómicas e de escolaridade da população residente na Freguesia do Lumiar, onde se integram bairros de classe média e média alta a par de alguns bairros muito degradados e grupos populacionais marginalizados (*Plano de Acção do Centro de Saúde do Lumiar - 1991*) devem ser tidas em conta ao analisar as opiniões e sugestões recolhidas. A elevada percentagem de pessoas com mais de 9 anos de escolaridade e com cursos médios e superiores justifica a formulação com muita frequência de comentários de carácter técnico, pouco usuais numa população menos escolarizada.

O facto de a componente essencial dos resultados deste estudo assentar nas respostas a uma pergunta aberta de carácter geral trouxe naturalmente dificuldades na análise do seu conteúdo e requer alguns cuidados na interpretação dos resultados apresentados. Assim:

- a) os comentários podem expressar, por vezes as vivências pessoais mais recentes quando da utilização dos serviços de saúde;
- b) o número de pessoas que mencionou determinado aspecto não corresponde a todas as pessoas preocupadas com esse problema, mas apenas àquelas a quem ocorreu falar dele no momento da entrevista;
- c) dado o carácter aberto da pergunta, as respostas espontâneas cobriram um espectro vasto de aspectos. Por isso, a repetição dos mesmos comentários ou sugestões por pessoas diferentes deve ser particularmente valorizado.

O facto de mais de metade dos respondentes disporem de um ou mais subsistemas, além do SNS evidencia uma magnitude apreciável de duplicações contrárias à utilização racional dos recursos da sociedade, considerada no seu todo.

A atitude colaborante da grande maioria dos inquiridos (80%) evidencia o interesse dos cidadãos pela melhoria dos seus serviços públicos de saúde. Não é de estranhar que 12% dos respondentes não tenham dado qualquer opinião na medida em que a resposta a este tipo de perguntas exige um esforço particular de avaliação e síntese crítica, difícil para algumas pessoas (idosos, por exemplo), no momento da entrevista. A proporção de pessoas que simplificaram a sua resposta, quer afirmando que estava tudo bem (3,6%) ou, pelo contrário, dizendo que estava tudo mal (5,4%) foi relativamente diminuta.

É de supor que num questionário com perguntas fechadas pré-codificadas se obteriam frequências superiores às encontradas em relação aos diversos aspectos a melhorar. A opção tomada permitiu, no entanto, a expressão espontânea do que mais preocupa os cidadãos. Assim, as frequências com que a acessibilidade e as atitudes dos profissionais foram mencionadas deve, de facto, preocupar os responsáveis pelas políticas e pela administração de saúde.

A acessibilidade e as atitudes dos profissionais para com os utentes/doentes, destacam-se claramente como os aspectos mais carentes de melhoria na opinião de todos os grupos etários, tanto no sexo feminino, como no masculino.

Os aspectos relacionados com infra-estruturas e recursos e com a humanização organizativa dos serviços foram mais mencionados pelas pessoas do grupo etário 25-44 anos, onde predominam as pessoas mais activas e que porventura representará uma geração mais crítica e exigente.

Os idosos parecem ser, em geral, menos exigentes que qualquer outro grupo etário, à excepção dos aspectos relacionados com custos e taxas em que a frequência com que foram mencionados foi idêntica às dos restantes grupos. Este facto poderá dever-se à dificuldade que alguns idosos tiveram em responder à pergunta aberta e/ou a uma tendência para serem mais complacentes com o que lhes é oferecido, até por comparação com as piores condições do passado.

A consistência interna dos resultados quanto às frequências com que foram mencionados os diversos grupos de aspectos pelas pessoas dos diversos grupos etários e de ambos os sexos (Quadros VIII e IX), valida suficientemente a metodologia mista qualitativa/quantitativa seguida no tratamento da variável «resposta à pergunta sobre o que deveria ser melhorado nos serviços públicos de saúde».

Conclusões

- Mais de metade dos cidadãos da freguesia estudada está coberta por outros subsistemas além do Serviço Nacional de Saúde, o que pode condicionar desperdício e ineficiência do sistema de saúde no seu todo;
- A *acessibilidade aos serviços públicos de saúde e as atitudes dos seus profissionais para com os utentes/doentes* foram os aspectos sentidos como mais carentes de melhoria;
- O facto de se terem encontrado diferenças estatisticamente significativas nas frequências

as com que certos aspectos foram mencionados nos diversos grupos etários, e não se terem encontrado diferenças entre os sexos, parece traduzir uma variação geracional das expectativas dos cidadãos;

- Há uma relativa unanimidade em relação aos aspectos a melhorar, embora os idosos pareçam ser, em geral, menos «exigentes», à excepção dos aspectos relacionados com custos e taxas.

Agradecimentos

Agradecimentos são devidos:

- às senhoras D. Maria Rosa Arrifes e D. Maria de Fátima Augusto pela colaboração dedicada e indispensável que prestaram em todo o processo de recolha de dados e do seu tratamento;
- aos diversos colegas que colaboraram na elaboração do Questionário, entre os quais se destacam o Dr. João Santos Lucas e o Dr. Luís Graça, da Cadeira de Ciências Sociais e Humanas da ENSP;
- ao Dr. Pedro Aguiar pelo apoio prestado na análise estatística;
- ao Senhor Presidente da Junta de Freguesia do Lumiar, Dr. Luís Caeiros, por todo o apoio logístico e colaboração de pessoal quer para a colheita da amostra aleatória, quer para a realização de entrevistas nas instalações da Junta de Freguesia;
- à Dr.^a Maria da Luz Tiago, Directora do Centro de Saúde do Lumiar pela colaboração dada em todo o projecto de investigação.

Referências bibliográficas

1. Kisil M. (1982) Administración pública en el sector salud para el decenio 1980-1990. I - Fundamento teórico: Elección pública y acción social. *Bol Of Sanit Panam* 92 (3): 248-255.
2. World Health Organisation (1993) Health care reforms in Europe. Proceedings of a first meeting of the Working Party on Health Care Reforms in Europe. Madrid, 23-24 June 1992. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe.
3. Hurst J.W. (1991) Reforming health care in seven European nations. *Health Affairs* 10 (3): 7-21.
4. Ministry of Welfare, Health and Cultural Affairs (1988) Changing health care in The Netherlands. Rijswijk: Ministerie van Welzijn, Volksegezondheid en Cultuur.
5. Secretaries of State for Health, Wales, Northern Ireland and Scotland (1989) Working for patients (Cm 555). London: HMSO.
6. Committee on Choices in Health Care (1992) Choices in health care. Rijswijk, The Netherlands: Ministry of Welfare, Health and Cultural Affairs.

7. Andersen Consulting (1993) The future of European health care. London: Andersen Consulting/Arthur Andersen & Co., S.C.
8. Kotler P.; Zaltman G. (1971) Social marketing: an approach to planned social change. *J. Marketing* 25 (7): 3-12.
9. Fine S.H. (1981) The marketing of ideas and social issues. New York: Praeger.
10. Blendon R.J.; Donelan K. (1989) British public opinion on National Health Service reform. *Health Affairs* 1 Winter: 52-62.
11. National Consumer Council (1993) Consumer concerns 1993. A consumer view of health services: the report of a MORI survey. London: National Consumer Council.
12. Saltman R.B. (1992) Patient choice and patient empowerment: a conceptual analysis. Stockholm: Swedish Center for Policy and Business Studies (Occasional paper n.º 40).
13. Norusis M.J./SPSS Inc (1990) SPSS/PC+ 4.0 Base manual. Chicago: SPSS Inc.
14. Carlwright A. (1989) User surveys of general practice. I - Some suggestions about how to do such surveys by post. London: Inst. for Social Studies in Medical Care.
15. Jacoby A. (1989) User surveys of general practice. II - Some findings from a postal survey of users' views and experiences of general practice. London: Institute for Social Studies in Medical Care.

QUADRO I DISTRIBUIÇÃO DOS RESPONDENTES POR SEXO E IDADE

Grupo etário	Sexo		Total n.º (%)*
	feminino n.º (%)*	masculino n.º (%)*	
18-24	28 (4,4)	26 (4,1)	64 (8,5)
25-44	118 (18,6)	104 (16,4)	222 (35,0)
45-64	150 (23,6)	96 (15,1)	246 (38,7)
≥ -65	72 (11,3)	40 (6,3)	112 (17,6)
Sem informação	—	—	1 (0,2)
Total	368 (58,0)	266 (41,9)	635 (100,0)

* As percentagens referem-se ao total de indivíduos (n = 635)

QUADRO II RESPONDENTES POR SEXO E GRUPO ETÁRIO EM RELAÇÃO À AMOSTRA ALEATORIAMENTE SELECIONADA

Grupo etário	Sexo feminino		Sexo masculino	
	Amostra	Respond. (%)	Amostra	Respond. (%)
18-24	41	28 (68)	52	26 (50)
25-44	175	118 (68)	166	104 (63)
45-64	187	150 (80)	133	96 (72)
> -65	86	72 (84)	46	40 (87)
Total	489	368 (75)	397	266 (67)

Amostra seleccionada: m = 886

Respondentes: n = 635 (72%)

QUADRO III
ESCOLARIDADE

Estudos concluídos	N.º	%
Analfabeto	41	6,6
Sabe ler e escrever	31	5,0
Escolaridade básica (4-6 anos)	189	30,2
Ensino básico		
- 5.º ano (9.º ano) ou equivalente	72	11,5
- 7.º ano (12.º ano) ou equivalente	77	12,3
Curso médio	48	7,7
Curso do ensino superior	167	26,7
Total*	625	100,0

* n = 635; sem informação = 10

QUADRO IV
SITUAÇÃO PROFISSIONAL/ACTIVIDADE

Situação	N.º	(%)
Activos com profissão	355	(56,5)
Desempregados	28	(4,5)
Donas de casa	58	(9,2)
Estudante	35	(5,6)
Reformados	140	(22,3)
Outra situação	12	(1,9)
Total*	628	(100,0)

* n = 635; sem informação = 7

QUADRO V
PROFISSÕES/OCUPAÇÕES DOS RESPONDENTES

Profissão/ocupação	Frequência	%
Advogados/Juristas/Juízes	10	1,7
Comerciantes e empresários industriais	27	4,5
Donas de casa	58	9,6
Economistas	8	1,3
Enfermeiros	5	0,8
Empregados de comércio e vendedores	32	5,3
Empregadas domésticas/limpezas	50	8,3
Engenheiros	21	3,5
Estudantes	34	5,6
Forças militares e militarizadas	12	2,0
Funcionários administrativos/serviços (Estado)	37	6,1
Funcionários administrativos/serviços (privados)	53	8,8
Gestores/Administradores	12	2,0
Médicos	11	1,8
Motoristas	15	2,5
Operários especializados	56	9,3
Operários indiferenciados	24	4,0
Professores (Ensino primário e secundário)	44	7,3
Professores universitários	7	1,2
Quadros técnicos superiores diversos	37	6,1
Quadros técnicos médios diversos	33	5,5
Restantes profissões	19	3,1
Total*	605	100,0

* n = 635; sem informação = 30

QUADRO VI
SISTEMAS/SUBSISTEMAS DE ACESSO E/OU FINANCIAMENTO DE CUIDADOS DE SAÚDE

Situação	Frequência	(%)
Só SNS	265	(43,0)
SNS + ADSE	88	(14,3)
SNS + ADME	18	(2,9)
SNS + SAMS	29	(4,7)
SNS + serviços de saúde de empresa	39	(6,3)
SNS + org. privada pré-pagas	22	(3,6)
SNS + Seguro-doença	28	(4,5)
SNS + outro subsistema	41	(6,7)
SNS + 2 subsistemas	74	(12,0)
SNS + 3 subsistemas	12	(1,9)
Total*	616	(100,0)

* n = 635; sem informação ou «não sabe» = 19

QUADRO VII
ADESÃO E TIPO DE RESPOSTA À PERGUNTA ABERTA SOBRE O QUE DEVERIA SER MELHORADO NOS SERVIÇOS PÚBLICOS DE SAÚDE

Tipo de respostas	Frequência	(%)
Comentários e sugestões concretos	506	(79,7)
Está tudo bem	21	(3,3)
Está tudo mal	30	(4,7)
Não responderam	78	(12,3)
Total	635	(100)

* n = 635; sem informação ou «não sabe» = 19

QUADRO VIII
«QUE DEVERIA SER MELHORADO NOS SERVIÇOS DE SAÚDE?»
(ASPECTOS ABORDADOS, POR SEXO)

Grupos de aspectos	Sexo fem.	Sexo masc.	Total	Sign. Estat.
	n.º (%)	n.º (%)	n.º (%)	
Aspectos relacionados com a acessibilidade	159 (48,5)	101 (44,1)	260 (46,7)	N.S.
Aspectos relacionados com a atitude dos profissionais para com os utentes/doentes	135 (41,2)	93 (40,6)	228 (40,9)	N.S.
Aspectos relacionados com infra-estruturas e recursos	108 (32,9)	84 (36,7)	192 (34,5)	N.S.
Aspectos relacionados com a humanização organizativa dos serviços (estrutura e funcionamento)	88 (26,8)	77 (33,6)	165 (29,6)	N.S.
Aspectos relacionados com custos e taxas	85 (25,9)	48 (21,0)	133 (23,9)	N.S.
Aspectos relacionados com a competência técnico-científica dos profissionais	63 (19,2)	39 (17,0)	102 (18,3)	N.S.
Aspectos relacionados com burocracia	29 (8,8)	31 (13,5)	60 (10,8)	N.S.
Aspectos relacionados com a informação, a educação para a saúde e a prevenção	37 (11,3)	22 (9,6)	59 (10,6)	N.S.

n = 557; foram excluídas as 78 pessoas que não deram qualquer opinião

QUADRO IX
«QUE DEVERIA SER MELHORADO NOS SERVIÇOS DE SAÚDE?»
(ASPECTOS ABORDADOS, POR GRUPO ETÁRIO)

Grupos de aspectos	Grupos etários - (%)				Total n.º (%)	Sign. Estat.
	18-24	25-44	45-64	>65		
Aspectos relacionados com acessibilidade	(49,0)	(49,2)	(45,8)	(42,0)	260 (46,7)	N.S.
Aspectos relacionados com a atitude dos profissionais	(42,9)	(45,6)	(37,8)	(37,5)	228 (40,9)	N.S.
Aspectos relacionados com infra-estruturas e recursos	(28,6)	(42,1)	(33,8)	(22,7)	192 (34,5)	p<0,05
Aspectos relacionados com a humanização organizativa	(28,6)	(33,8)	(31,1)	(17,0)	165 (29,6)	p<0,05
Aspectos relacionados com custos e taxas	(28,6)	(21,5)	(25,3)	(22,7)	133 (23,9)	N.S.
Aspectos relacionados com a competên. técnico-científica	(20,4)	(18,5)	(20,9)	(10,2)	102 (18,3)	N.S.
Aspectos relacionados com a burocracia	(12,2)	(10,8)	(14,2)	(1,1)	60 (10,8)	p<0,01
Aspectos relacionados com a informação, educação p/saúde e prevenção	(8,2)	(13,3)	(11,1)	(4,5)	59 (10,6)	N.S.

n = 557; foram excluídas as 78 pessoas que não deram qualquer opinião (respondentes/grupo etário: 18-24 = 49; 25-44 = 195; 45-64 = 225; ≥65 = 88)

Dados preliminares para o estudo da morbilidade em psicogeriatría

*Olívia Robusto Leitão**

RESUMO

O acompanhamento, ao longo de cinco anos (1991-96), dos doentes de uma Consulta de Psicogeriatría em Lisboa, revela resultados que apontam para uma elevada prevalência de depressão e défice cognitivo, bem como de patologia cardiovascular nos idosos, que sendo melhor vigiadas, levariam certamente a significativos benefícios quer para a população em causa, em particular, quer para a comunidade em geral.

Palavras-chave: Psicogeriatría; Morbilidade; Doenças Cardiovasculares; Risco; Prevenção.

SUMMARY

The results of a five year follow-up study (1991-96), at a Psychogeriatric Outpatient Clinic in Lisbon, allow us to think that there is a high prevalence of depression and impairment of cognition, as well as cardiovascular diseases, which could be susceptible of better prevention, with significant benefit for the patients and the community.

Keywords: Psychogeriatrics; Morbidity; Cardiovascular Diseases; Risk; Prevention.

Introdução

No actual Sistema de Informação de Saúde Portugêses verifica-se ainda uma razoável falta de dados relativamente à influência que determinadas doenças sistémicas, nomeadamente as doenças cardiovasculares, têm sobre a patologia de Saúde Mental na 3.^a idade, mais especificamente em algumas formas de doenças depressivas e defeito cognitivo, ou mesmo demências^{2,3,6}.

Objectivo

Uma mais sistemática e ampla informação de dados colhidos em Consultas de Geriatria e Psicogeriatría permitiria alertar os colegas Internistas, Generalistas e Cardiologistas para a vantagem em melhorar o sistema de vigilância cardiovascular, preventiva e curativa, em toda a população em ge-

ral e ao longo de toda a vida, e nos idosos em particular⁷.

Neste caso concreto interessar-nos-ia, por exemplo, saber se uma vigilância precoce e mantida das doenças cardiovasculares é susceptível de contribuir para uma redução significativa das doenças cerebrovasculares, e conseqüentemente da decorrente patologia afectivo-cognitiva no idoso.

Material e métodos

Procedeu-se assim à colheita de dados para o estudo da morbilidade numa população de 3.^a idade, residente numa área definida urbana, da velha Lisboa, e frequentadora da mesma Consulta de Psicogeriatría.

População sob observação

Todos os doentes são à partida incluídos e obedecem aos critérios usualmente utilizados nesta espe-

* Assistente Graduada de Psiquiatria, Santa Casa da Misericórdia de Lisboa.

cialidade (mais de 65 anos de idade e patologia psíquica ou cognitiva)¹³. O atendimento é feito de forma independente pela médica Psiquiatra e pela Assistente Social, faltando na maior parte dos casos uma razoável articulação com o Médico Internista ou Generalista.

O diagnóstico psiquiátrico (Tab. 1 e 2) (Quadro I), foi efectuado com base na DSM-III-R⁴, por esta ser universalmente aceite, e possibilitar um bom quadro multidiagnóstico através do seus cinco eixos (isto é, nas áreas psiquiátrica, médica e social). Esta informação diagnóstica consta na 1.ª folha de todos os processos clínicos. O eixo II (referente a perturbações de personalidade) foi aqui considerado equivalente ao eixo I, dada a finalidade deste levantamento.

O diagnóstico médico (Tab. 3 e 4) (Quadro II) baseia-se na ICD 10 (International Classification of Diseases, 10th edition), por ser universalmente aceite e adequada ao estudo em questão.

O balanço geral dos dados é feito de 12 em 12 meses.

Resultados

Desde o início da Consulta (Abril 91) até agora (Abril 96) tem-se detectado, na generalidade, uma prevalência predominante de depressões e de doenças cardio e cerebrovasculares (Quadro III).

Verificou-se que é sobretudo nos casos com patologia cardiovascular e, ou metabólica mal compensada (tais como hiper ou hipotensões arteriais, diabetes e dislipidémias), à qual corresponde o maior número de patologia cerebral vascular, que se encontra a prevalência mais elevada de depressões e defeito cognitivo⁵ (Tab 1 e 3).

Regista-se um predomínio de mulheres em relação aos homens (Tab. 5), sendo o grupo etário dos 65 aos 69 anos maioritário em ambos os sexos.

Os óbitos conhecidos situam-se na faixa etária dos 80-89 anos (Tab. 6).

Desenvolvimento

Numa 2.ª fase prevê-se:

- 1.º Considerar factores diversos associados (de eventual confundimento tais como: pobreza, solidão, estilos de vida, ocupação, acuidade diagnóstica).
- 2.º Avaliar a eficácia de uma vigilância médica regular nas áreas temáticas indicadas (cardiovascular e metabólica).

- 3.º Determinar a significância estatística.

Conclusão

A finalidade é proceder à divulgação de dados de uma amostra da população portuguesa, e simultaneamente informar e alertar os colegas de Medicina Interna, Clínica Geral, Geriatria e Cardiologia para uma vigilância permanente que se afigura de fácil execução e relativo baixo custo^{8,9}, quando comparada com os elevados encargos financeiros e humanos que um idoso deprimido, intelectualmente limitado e fisicamente incapacitado, em regra e bem cedo acaba por representar¹¹.

Estas considerações parecem pertinentes perante uma população idosa, que aparenta ter uma elevada prevalência de depressão, défice cognitivo de grau variado, e doenças cardio e cerebrovasculares^{10,12,14,15,16,17}.

Bibliografia

1. «Apoio Social aos Idosos da Cidade de Lisboa». Misericórdia de Lisboa, 1995.
2. Aronson, M.; Ooi W.; Morgenstern, H.; Hafner, A.; Masur, D.; Crystal, H.; Frishman, W.; Fisher, D.; Katzman, R. – Women, myocardial infarction and dementia in the very old. *Neurology*, 1990; 40: 1102-1106.
3. Clothier, J.; Grotta, J. – Recognition and management of post stroke depression in the elderly. *Clinics in Geriatric Medicine*, 1991 7 (3) August.
4. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Third Edition Revised*, The American Psychiatric Association 1987.
5. Guerreiro, M. – Aspectos neuropsicológicos das demências vasculares. *Geriatrics*, 1991; 4 (32): 37-40.
6. Hachinski, V.; Iliff, L.; Zilhka, E.; du Boulay, G.; McAllister, V.; Marshall, J.; Russell, R.; Symon, L. – Cerebral Blood Flow in Dementia. *Arch Neurol*, 1975; 32: 632-637.
7. Lechner, H. – Arteriosclerosis: Preventable, Treatable (letter) *IPA Bulletin*, Winter 1995 Spring 1996.
8. Meyer, J.S.; Judd, B.W.; Tawakina, T.; Rogers, R.; Mortel, K.F. – Improved Cognition after control of Risk Factors for Multi-infarct Dementia. *JAMA*, 1986; 256 (16): 2203-2209.
9. Meyer, J.; McClintic, K.; Rogers, R.; Sims, P.; Mortel, K. – Aetiological considerations and risk factors for multi-infarct dementia. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 1988; 51: 1489-1497.
10. Rapoport, I.; Morris, P. – Depression and dementia in the elderly multi-infarct disease. In: *Démences et dépressions*. Actes du 5^{ème} Congrès: Paris, 1989, Maloine, 1989: 64-85.
11. Robinson, R.; Morris, P.; Federoff, J. – Depression and cerebrovascular disease. *J Clin Psychiatry* 51 (suppl): 26, 1990.
12. Rocca, W.; Hofman, A.; Brayne, C.; Breteler, M.; Clarke, M.; Copeland, J.; Dartigues, J.-F.; Engedal, K.; Hagnell, O.; Heeren, T.; Jonker, C.; Lindesay, J.; Lobo A.; Mann, A.; Mölsä, P.; Morgan, K.; O'Connor, D.; Droux, A.; Sulkava, R.; Kay, D.; Amaducci, L. – The Prevalence of Vascular Dementia in Europe: Facts and Fragments from 1980-1990 Studies. *Ann Neurol* 1991; 30: 817-824.
13. Ton, A.; Roulaux, H.; Oei, T.; and Jansen op de Haar M. – A Decade of Psychiatric Consultation with Elderly Patients in a

- Dutch General Hospital. *International psychogeriatrics*, 1993; (5) 1: 103-108.
14. Scheinberg, P. – Dementia Due to Vascular Disease – A Multifactorial Disorder. *Stroke* 1988; 19: 1291-1299.
15. Starkstein, S.E.; Robinson, R.G.; Price, T.R. – Comparison of patients with and without poststroke major depression matched for size and location of lesion. *Arch. Gen. Psychiatry*, 1988; 45 (3): 247.

16. Tatemichi, T. – How acute brain failure becomes chronic: a view of the mechanisms of dementia related stroke. *Neurology*, 1990; 40: 1652-1659.
17. Tresch, Folstein, Rabins, Hazzard – Prevalence and significance of cardiovascular disease and hypertension in elderly patients with dementia and depression. *J Am Geriatr Soc* 1985; 33: 530.

APÊNDICE

TABELA 1
CONSULTA DE PSICOGERIATRIA
Misericórdia de Lisboa

MORBILIDADE PSIQUIÁTRICA

24-05-1996

Patologia Psiquiátrica	DSM III R	H65-69	M65-69	H70-74	M70-74	H75-79	M75-79	H80-84	M80-84	H85-89	M85-89	H90-94	M90-94
Sem perturbação psiquiátrica	71.09	0	1	0	5	3	2	2	1	0	0	0	0
Perturbação de adaptação	309	2	2	2	1	0	1	0	2	0	1	0	0
Alteração do comportamento	312.39	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Perturbação da personalidade	301	9	7	5	7	2	9	1	5	0	4	0	0
Acompanhamento temporário (life-event)	62.89	1	2	1	1	0	2	0	1	0	0	0	0
Perturbação ansiosa não específica	300	2	7	2	1	0	2	0	0	0	1	0	0
Perturbação distímica	300.4	0	5	0	4	0	2	0	1	0	0	0	0
Perturbação dissociativa não especif.	300.15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Perturbação somatoforme	300.7	0	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Perturbação obsessivo-compulsiva	300.3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Perturbação de pânico	300.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Perturbação depressiva (não espec./react.)	311	5	13	4	12	3	8	0	5	0	0	0	0
Depressão maior	296	3	8	0	7	1	4	0	2	0	0	0	0
Ciclotimia	301.13	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
Perturbação bipolar	296.7	2	4	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0
Provável perturbação tímica orgânica	293.83	0	5	0	3	0	3	0	2	0	0	0	0
Perturbação paranóide	297.1	1	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Perturbação delirante	297.1	0	2	2	1	0	3	0	2	0	0	0	0
Perturbação delirante orgânica	293.83	0	1	0	0	0	0	0	2	0	3	0	0
Estado alucinatorio orgânico	293.82	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Perturbação mnésica não específica	294	1	3	1	0	0	4	0	1	0	1	0	0
Perturbação cognitiva minor		1	3	0	0	0	2	0	1	0	0	0	1
Perturbação cognitiva acentuada		0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0
Perturbação mental orgânica não espec.	294.8	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Demência?	290	0	0	0	0	0	2	2	0	0	1	0	0
Demência (confirmada)	290	4	7	1	3	0	1	0	4	0	1	0	1
Dependência etilica	303.9	1	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0

N = 255

TABELA 2
CONSULTA DE PSICOGERIATRIA
Misericórdia de Lisboa

MORBILIDADE PSIQUIÁTRICA

24-05-1996

Patologia Psiquiátrica	DSM III R	Total 65-69	Total 70-74	Total 75-79	Total 80-84	Total 85-89	H90-94	Total 90-94	Total 65-94
Sem perturbação psiquiátrica	71.09	1	6	5	3	0	0	0	15
Perturbação de adaptação	309	4	3	1	2	1	0	0	11
Alteração do comportamento	312.39	2	0	0	0	0	0	0	2
Perturbação da personalidade	301	16	13	11	6	4	0	0	50
Acompanhamento temporário (life-event)	62.89	3	2	2	1	0	0	0	8
Perturbação ansiosa não específica	300	9	3	2	0	1	0	0	15
Perturbação distímica	300.4	5	4	2	1	0	0	0	12
Perturbação dissociativa não especif.	300.15	0	0	0	0	0	0	0	0
Perturbação somatoforme	300.7	0	3	1	0	0	0	0	4
Perturbação obsessivo-compulsiva	300.3	0	1	0	0	0	0	0	1
Perturbação de pânico	300.01	0	0	0	0	0	0	0	0
Perturbação depressiva (não espec./react.)	311	18	16	11	5	0	0	0	50
Depressão major	296	11	7	5	2	0	0	0	25
Ciclotimia	301.13	1	0	1	1	0	0	0	3
Perturbação bipolar	296.7	6	1	2	0	0	0	0	9
Provável perturbação tímica orgânica	293.83	5	3	3	2	0	0	0	13
Perturbação paranóide	297.1	1	3	0	0	0	0	0	4
Perturbação delirante	297.1	2	3	3	2	0	0	0	10
Perturbação delirante orgânica	293.83	1	0	0	2	3	0	0	6
Estado alucinatorio orgânico	293.82	0	0	1	0	1	0	0	2
Perturbação mnésica não específica	294	4	1	4	1	1	0	0	11
Perturbação cognitiva minor		4	0	2	1	0	0	1	8
Perturbação cognitiva acentuada		0	2	2	0	0	0	0	4
Perturbação mental orgânica não espec.	294.8	1	0	1	1	0	0	1	4
Demência?	290	0	0	2	2	1	0	0	5
Demência (confirmada)	290	11	4	1	4	1	0	1	22
Dependência etilica	303.9	3	2	2	1	1	0	0	7

N = 255

TABELA 3
CONSULTA DE PSICOGERIATRIA
Misericórdia de Lisboa

MORBILIDADE MÉDICO-CIRÚRGICA

24-05-1996

Patologia médico-cirúrgica	H65-69	M65-69	H70-74	M70-74	H75-79	M75-79	H80-84	M80-84	H85-89	M85-89	H90-94	M90-94	Total 65-94
Alteração médica não esclarecida	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Intoxicação medicamentosa	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
D. cardíaca	4	20	3	19	6	14	3	6	0	3	0	2	80
D. vascular periférica	2	4	2	1	0	2	0	0	0	1	0	0	12
D. vascular cerebral	5	7	2	6	2	5	0	1	0	0	0	0	28
Hipertensão arterial	6	19	3	13	2	19	2	2	0	3	0	0	69
Dislipidémia	2	8	1	11	1	1	0	3	0	1	0	0	28
Hiperuricémia/urémia	4	1	0	1	0	2	0	0	0	2	0	0	10
Diabetes	4	2	1	1	0	7	0	4	0	0	0	0	19
Anemia	0	3	1	2	0	1	1	0	0	0	0	0	8
D. sangue (outras)	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2
Desnutrição	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Déficé folatos/vit. B 12	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Disfunção tireóide	0	4	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	7
D. apar. respiratório	3	0	1	0	7	0	5	0	0	0	0	0	16
D. ginecologia	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
D. Dermatologia	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
D. ORL	2	5	2	7	1	1	0	2	0	4	0	0	25
Glaucoma	1	6	1	0	0	2	0	1	0	0	0	0	11
Catarata	0	5	1	4	0	6	0	3	0	0	0	0	19
Amaurose	2	1	0	2	0	2	1	2	0	0	0	0	10
Quisto renal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D. Nefro-Urologia (sem quisto renal)	6	6	2	1	3	3	3	2	0	1	0	0	27
D. Reumatologia	2	7	3	10	2	8	2	3	0	1	0	1	39
D. Ortopedia	1	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4
D. infecciosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Alergias	3	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	8
Cefaleias acentuadas	0	2	0	1	0	2	0	0	0	1	0	0	6
Tremor	0	3	1	5	1	0	0	2	0	0	0	0	12
Estereotípias acentuadas	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3
D. Parkinson	1	1	0	2	0	2	1	0	0	0	0	0	7
Patol. neurocirurgia	1	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	5
Lesão cerebral orgão. (não tumoral, nem vasc.)	5	6	1	1	0	4	1	0	0	0	0	0	18
Epilepsia	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
Cirurgia geral	0	2	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	6
Tumores malignos	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	3
D. apar. gastrointestinal	9	9	3	9	4	4	0	6	3	0	0	0	47
Vida socioeconómico-familiar													
Problemas graves	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

N = 255

TABELA 4
CONSULTA DE PSICOGERIATRIA
Misericórdia de Lisboa

MORBILIDADE MÉDICO-CIRÚRGICA

24-05-1996

Patologia médico-cirúrgica	Total 65-69	Total 70-74	Total 75-79	Total 80-84	Total 85-89	Total 90-94	Total 65-94
Alteração médica não esclarecida	0	0	0	0	0	0	0
Iatrogenia medicamentosa	0	0	0	1	0	0	1
D. cardíaca	23	23	20	9	3	2	80
D. vascular periférica	6	3	2	0	1	0	12
D. vascular cerebral	12	8	7	1	0	0	28
Hipertensão arterial	25	16	21	4	3	0	69
Dislipidemia	10	12	2	3	1	0	28
Hiperuricemia/urémia	5	1	2	0	2	0	10
Diabetes	6	2	7	4	0	0	19
Anemia	3	2	1	1	0	0	8
D. sangue (outras)	1	0	1	0	0	0	2
Desnutrição	1	0	0	0	0	0	1
Défice folatos/vit. B 12	1	0	0	0	0	0	1
Distúrbio da tireóide	4	2	0	0	0	1	7
D. apar. respiratório	3	1	7	5	0	0	16
D. ginecologia	2	3	0	0	0	0	5
D. Dermatologia	0	2	0	0	0	0	2
D. ORL	7	10	2	0	2	4	25
Glaucoma	7	1	2	1	0	0	11
Catarata	5	5	6	3	0	0	19
Amaurose	3	2	2	3	0	0	10
Quisto renal	0	0	0	0	0	0	0
D. Nefro-Urologia (sem quisto renal)	12	3	6	5	0	0	27
D. Reumatologia	9	13	10	5	1	1	39
D. Ortopedia	1	2	0	0	1	0	4
D. infecciosa	0	0	0	0	0	0	0
Alergias	4	2	2	0	0	0	8
Cefaleias acentuadas	2	1	2	0	1	0	6
Tremor	3	6	1	2	0	0	12
Estereotípias acentuadas	1	2	0	0	0	0	3
D. Parkinson	2	2	2	1	0	0	7
Patol. neurocirurgia	2	2	1	0	0	0	5
Lesão cerebral orgân. (não tumoral, nem vasc.)	11	2	4	1	0	0	18
Epilepsia	4	0	0	0	0	0	4
Cirurgia geral	2	2	1	1	0	0	6
Tumores malignos	0	0	2	1	0	0	3
D. apar. gastrintestinal	18	12	8	0	0	0	47
Vida socioeconómico-familiar							
Problemas graves	0	0	0	0	0	0	0

N = 255

QUADRO I
CONSULTA DE PSICOGERIATRIA
Misericórdia de Lisboa

PATOLOGIA PSIQUIÁTRICA (DSM-III R)

(N = 255)

(Abril 91-Abril 96)

	N.º Casos
Pert. Depressiva (Não especif. ou reactiva)	50
Depressão maior	25
Pert. bipolar	9
Provável pert. tímica orgânica	13
Ciclotímia	3
Perturb. da personalidade	50
Demência	22
Demência (possível?)	5
Pert. cognitiva	12
Pert. mnésica não específica	11
Pert. ansiosa não específica	15
Pert. distímica (tardia?)	12
Pert. de adaptação	11
Pert. delirante	10
Pert. delirante orgânica	6
Estado alucin. orgânico	2
Perturb. paranóide	4
Pert. obsessivo-compulsiva	1
Perturb. somatoforme	4
Alter. do comportamento	2
Acompanham. temporário pontual	8
Sem perturb. psiquiátrica	15

QUADRO II
CONSULTA DE PSICOGERIATRIA
Misericórdia de Lisboa

PATOLOGIA MÉDICO-CIRÚRGICA

(N = 255)

(Abril 91-Abril 96)

	N.º Casos
Alteração médica não esclar.	0
D. cardíaca	80
Hipertensão arterial	69
D. Vascul. Cerebral	28
D. Vascul. Periférica	12
D. Gastrintestinal	47
D. Reumática (acentuada)	39
Dislipidémia	28
Diabetes	19
Hiperuricémia	10
Lesão Cerebral Orgânica	18
Urologia/Nefrologia	27
Otorinolaring.	25
Cataratas	19
Glaucoma	11
Amaurose	10
Cefaleias (acentuadas)	6
Epilepsia	N4
D. Apar. Respirat.	16
Tremor	12
D. Parkinson	7
Alergias	8
Desnutrição	1
Disfunção da tiróide	7
Cirurgia Geral	6
D. Hematologia	10
D. Ginecológica	5
D. Dermatológica	2
Tumores malignos	3
D. Ortopédica	4
D. Neurocirúrgica	5
Défice Folato/Vit. B12	1
Intoxicação medicamentosa	1

QUADRO III
CONSULTA DE PSICOGERIATRIA
S. Psiquiatria-Misericórdia de Lisboa

	Depressão (n.º casos)	Def. cogn. lig. + Demências (n.º casos)	D. cardio e cerebrovasc. (n.º casos)	Diabetes (n.º casos)	Dislipidémias (n.º casos)	Doentes (n.º total)
Abr. 91-92	28	13	46	5	3	64
Abr. 91-95	85	46	158	17	23	196
Abr. 91-96	100	50	205	19	28	255

TABELA 5
CONSULTA DE PSICOGERIATRIA
S. Psiquiatria-Misericórdia de Lisboa

Abr. 1991-96 N = 255 (H = 58; M = 197)

Idade	Homens	Mulheres	Total	Falecidos
65-69	21	66	90	3
70-74	11	48	60	1
75-79	13	36	51	2
80-84	6	24	34	4
85-89	1	8	13	4
90-94	1	5	7	1

TABELA 6
ÓBITOS PARTICIPADOS
CONSULTA DE PSICOGERIATRIA
S. Psiquiatria-Misericórdia de Lisboa

Abr. 1991-96 N = 255 (H = 58; M = 197)

Idade	Homens	Mulheres	Total
65-69	0	3	3
70-74	1	0	1
75-79	2	0	2
80-84	1	3	4
85-89	1	3	4
90-94	0	1	1

Some aspects of cellular immune response to recombinant hepatitis B virus surface antigen in haemodialysed chronic carriers of hepatitis B virus

Albertina M. Freitas*

Artur A. Paiva*

Ana M. C. Silva*

José M. C. Gomes*

Henriqueta Brêda Coimbra*

RESUMO

Neste estudo analisámos alguns aspectos da resposta imunológica celular em hemodialisados (HD) portadores crónicos do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (AgHBs).

O nosso objectivo foi averiguar se a resposta imunológica aberrante, observada nesses doentes, resultava de deficiências nas células imunocompetentes e/ou de algum factor sérico inibidor específico.

Comparámos a resposta proliferativa celular (pelo emprego de testes de transformação linfoblástica) ao AgHBs recombinante dos HD portadores crónicos com a de alguns grupos controlo (HD seronegativos e com anticorpos anti-HBs adquiridos por infecção natural ou por vacinação), na presença de soros autólogos ou heterólogos. Avaliámos também o *status* imunológico dos portadores crónicos e dos grupos controlo pelo emprego de alguns testes imunocitoquímicos e funcionais.

Os nossos resultados mostraram uma diminuição significativa da proliferação linfocitária ao AgHBs nos HD portadores crónicos, relativamente aos grupos controlo. Não se verificaram, contudo, ao nível estudado, diferenças significativas no *status* imunológico. Além disso, o soro dos HD portadores crónicos pareceu não conter um factor inibidor específico da resposta ao AgHBs recombinante.

Palavras-chave: Hemodialisados, portadores-crónicos, proliferação-celular, AgHBs.

SUMMARY

In this report we analysed some aspects of cellular immune response in haemodialysed (HD) chronic carriers of hepatitis B surface antigen (HBsAg).

In order to investigate if the aberrant immune response to HBsAg observed in these patients results from deficiencies in the immunocompetent cells and/or from specific inhibitor serum factor, we compared the cellular response of HD chronic carriers to recombinant HBsAg (rHBsAg) with HD control groups [patients with naturally or artificially acquired anti-HBs antibodies and HD without hepatitis B (HBV) virus-related markers] both in the presence of autologous or heterologous sera. We also evaluated the immunological cellular *status* of chronic carriers and control groups using some immunocytochemical and functional tests.

Our results show a significantly lower response to HBsAg in the chronic carriers when compared with the control groups in spite of the fact that the immunological *status*, as evaluated in this study, did not show statistically significant differences. Besides, the sera exclude the presence of a specific inhibitor factor of rHBsAg response in the sera of chronic carriers.

Keywords: Haemodialysed, chronic-carriers, cellular-proliferation, HBsAg.

* Histocompatibility Centre of Coimbra

Introduction

In the majority of cases of infection with HBV hepatocellular necrosis is followed by viral elimination and recovery^{1,2}. However, in some patients (usually 5-10% of infected adults) high levels of viral surface antigen in the blood persist for several years or even for a lifetime and antibodies against HBsAg do not appear. The virus survives in the hepatocytes¹ or in the other types of cells³ and the patient becomes a chronic carrier. In the haemodialysis units in the Central Region of Portugal, the percentage of chronic carriers exceeds 14%. This finding prompted us to undertake a more detailed study of the pathogenesis of HD chronic carriers. Previous reports showed that these patients have a selective defect in their host immune response to HBV⁴⁻⁶. Nevertheless, there is marked immunological heterogeneity among patients with chronic HBV infection: some individuals show enhanced suppressor cell function and others respond as normal individuals. Some authors share the opinion that viral persistence seems to be predominantly due to the immunoregulatory abnormalities caused by HBV or by viral protein products^{7,8}. Others suggest that, as observed with healthy individuals vaccinated with the viral surface antigen who do not synthesize the correspondent antibody, genetic factors could contribute to the HBs antigenemia⁹⁻¹³. In addition, viral envelope mutants could also occur which enable the virus to escape the immune surveillance¹⁴⁻¹⁹.

Materials and methods

Patients. We studied 4 groups of haemodialysed subjects (Table I): chronic carriers of HBV (CCHBV, n = 9); patients with anti-HBsAg antibodies acquired by viral infection (ANTI-HBs Pos, n = 9) or by vaccination (VACC., n = 7) and patients without HBV-related markers (HBV Neg., n = 5). All patients were negative to HBV-DNA, anti-hepatitis C virus and anti-HIV-1 and 2. We did not find anti-HLA antibodies in any patients serum.

Serology. Serological markers (HBsAg, HBeAg, Anti-HBs, Anti-HBe, Anti-HBc, Anti-HCV and Anti-HIV-1 and 2) were measured by commercial RIAs or EIAs (Abbott Laboratories, Wokingham, U.K.; Sorin Biomedica, Saluggia, Italy; Ortho Diagnostics, Rakitan, N.J. USA and Genetic System Corporation, Redmond, USA).

Cell isolation and culture conditions. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained

by centrifugation over a «Ficoll-Hypaque» gradient (Lymphoprep – Nycomed Pharma, Oslo, Norway) from heparinised venous blood prior to the start of a dialysis session. With the aim of analysing cellular proliferation to rHBsAg (SmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium), 1×10^5 PBMC were distributed in 0.2 ml aliquots into flat-bottomed 96-well plate and cultured in the presence of different concentrations of rHBsAg (10, 25, 50 and 100 pg/ml). We used as complement functional test the blast transformation test^{20,22} performed with phytohaemagglutinin (PHA, Wellcome Diagnostics, England; 1 µg/ml, final dilution), pokeweed mitogen (PWM – Gibco Life Technologies, Grand Island, N.Y., USA, 1/500 final dilution) and 4β-phorbol-12β-myristate-13α-acetate (PMA, Sigma, Chemical Company, St. Louis, USA, 25 ng/ml final dilution). These concentrations were chosen since they gave maximal cellular proliferation in CCHBV and in control groups lymphocyte cultures. Both cellular cultures were incubated at 37° C in a moist atmosphere of 5% CO₂/95% humidified air environment for 3 (mitogenic cultures) or 7 days (antigenic cultures). RPMI 1640 (Gibco – Life Technologies, Paisley, Scotland) supplemented with penicillin/streptomycin (Biological Industries; 200 UI/ml and 200 µg/ml, respectively), amphotericin B (Fungizone, Gibco – Life Technologies Grand Island, N.Y. USA; 12.5 µg/ml) and 10% of autologous serum or heterologous pools of sera (of HBV-Neg., ANTI-HBs Pos. and CCHBV groups) was the culture medium employed.

In order to access II-2 (Biotrak, Amersham International, U.K.; ELISA method) and II-2 receptor, after mitogenic or antigenic stimulus, cells were cultivated at 2×10^6 /ml (3 ml) with the same culture medium for 2 days (with PHA and PMA) and 6 days (with rHBsAg).

Blast transformation. Cell cultures were pulsed with 1 µCi of ³H-thymidine (³H-TdR, 1 mCi/ml; Amersham) for 18 h before harvesting and after 3 or 7 days in culture. Incorporation of ³H-TdR was measured by a standard liquid scintillation counting technique²⁰ after collecting the cells onto filters. Data were expressed as the average counts per minute (cpm) for quadruplicate cultures.

In control cultures the mitogen was omitted.

Staining. Fresh PBMC ($1-2 \times 10^6$) were first incubated with mouse monoclonal antibodies (mAb) to human CD3, CD4, CD8, CD25 (Dako, Denmark) for 30 minutes at 4° C and subsequently with rabbit fluorescein-conjugated anti-mouse mAbs under similar conditions (indirect method); we also incubated PBMC with sheep fluorescein-conjugated anti-human surface immunoglobulins (sIg) (Wellcome Diagnostics, England) (direct method).

Mitogen-stimulated PBMC (only incubated with PHA and PMA) were first stained by direct method with mouse rodamine-conjugated anti-human CD4 or CD8 mAbs (Coulter Immunology, Hialeah, Florida) and thereafter by indirect method to the CD25 marker, as already described.

The PBMC were analysed using a flow cytometer (Epics-Profile II-Coulter)²³.

Statistical analysis. Comparisons between groups were made using the Student's *t* - test for unpaired data and $p < 0,05$ was considered significant.

Results

Evaluation of lymphocyte proliferation to rHBsAg in the presence of autologous serum

The results (evaluated in stimulation index \pm standard error - $SI \pm SE$) showed that the CCHBV group have a proliferative response of $2,41 \pm 0,14$; the ANTI-HBs Pos group of $2,79 \pm 0,25$ and the VACC group of $3,94 \pm 0,79$, whereas the HBV Neg group did not show any response ($SI < 2$) (Table II). The proliferative response that we have found in the CCHBV group revealed a statistical significance when compared with VACC group ($p = 0,0001$) and with ANTI-HBs Pos group ($p = 0,042$).

Six out of the 9 patients of the ANTI-HBs Pos and the CCHBV groups and 6 out of 7 of the VACC group were considered responders (individual $SI \geq 2$), whereas none of the patients without HBV-related markers responded. In addition, while CCHBV patients preferably used rHBsAg concentrations above 50 pg/ml (4 out of the 6 responders) the other groups used concentrations below that value (4 out of 6 and 5 out of 6 responders in the VACC and ANTI-HBs Pos groups, respectively).

Influence of heterologous sera in cellular response to rHBsAg

The effect of pools of the different sera on rHBsAg induced lymphocyte transformation, the number of responders and the number of patients who needed concentrations of 50 pg/ml or below to produce significant cellular response (SI higher or equal to 2) is shown in Fig. 1.

Cellular cultures of the two groups with anti-HBs antibodies in the presence of pooled sera from chronic carriers showed a proliferative response (mean of SI) of 2,15 in the HD anti-HBs positive group

and 1,50 in the HD VACC group. The later group have a statistically significant difference ($p = 0,0006$) when compared with autologous sera (mean of $SI = 3,94$).

In the VACC group 2 out of the 6 patients are responders (individual $SI \geq 2$), one of those needed rHBsAg concentrations ≤ 50 pg/ml. In the anti-HBs positive group 4 out of 7 patients are responders, two of those required lower concentrations of rHBsAg.

In the presence of pooled sera from HD without serological markers of HBV we found a proliferative response of 2,19 in cellular cultures of the CCHBV group and 2,83 in the cultures of the HD with antibodies acquired by viral infection. In the CCHBV group 4 out of 7 HD are responders and all of them needed concentrations below or equal to 50 pg/ml. In the ANTI-HBs Pos group 4 out of 7 are responders, 3 of those required lower concentrations of rHBsAg (≤ 50 pg/ml).

Cellular cultures of CCHBV and VACC groups in the presence of pooled sera from patients with anti-HBs antibodies revealed a proliferative response of 1,35 in the CCHBV group and 3,50 in the VACC group. The former group have a statistical significance ($p = 0,032$) when compared with autologous sera (mean SI of 2,26). In the CCHBV group none of the patients responded ($SI < 2$), whereas in the VACC group 5 out of 6 HD are responders (individual $SI \geq 2$), 4 of them requiring concentrations below or equal to 50 pg/ml.

Pool of sera of chronic carriers contained 27 μ g/ml of HBsAg.

In all tested cultures IL-2 was undetectable by the available test (data not shown).

Evaluation of immune status of HD patients

Cellular phenotyping. Comparative immunocytochemical test performed with PBMC did not show significant differences in the T and B cellular populations and in T subpopulations between CCHBV and control groups (table III).

Cellular activation. The analysis of the IL-2 receptor expression on CD4 and CD8 T-cell subsets after PBMC stimulation with PHA and PMA did not show statistically significant differences between CCHBV and control groups (table IV).

In addition, there was also no differences in the dosage of IL-2 in supernatants of mitogen (PHA and PMA) cultures performed in CCHBV and in control groups.

Cell proliferation. Cell proliferation as measured by lymphocyte transformation in response to PHA, PMA and PWM (evaluated in SI) did not show statis-

tically differences between patients of the HD CCHBV and of the control groups (table V).

Discussion

Our results showed that chronic carriers of HBV had a significantly decreased lymphocyte transformation in response to rHBsAg when compared to the control groups, requiring higher rHBsAg concentrations to obtain maximal response. In order to explain this impairment of the proliferative response in chronic carriers of HBV we measured the lymphocyte transformation to rHBsAg after substituting autologous sera for heterologous sera derived from the other groups.

When we stimulated lymphocytes of haemodialysed with anti-HBs antibodies acquired either by viral infection or by vaccination with rHBsAg, in the presence of pooled sera of chronic carriers, that contain a high concentration of viral surface antigen, we verified a decrease both in lymphocyte proliferation and in the percentage of patients that required rHBsAg concentration less than 50 pg/ml. These results seem to suggest that chronic carriers sera, containing an excess of HBsAg, block the rHBsAg capture or peptidic presentation to lymphocytes, as seems to be confirmed by cellular cultures of CCHBV in the presence of pooled sera from HD patients without serological markers of HBV by reducing the concentrations of rHBsAg to obtain maximal response.

To exclude this interference in cultures of CCHBV in presence of autologous sera, we also studied the cellular behaviour of these patients to rHBsAg in the presence of pooled sera from haemodialysed without serological markers of HBV. This pool of sera showed little effect both in the number of responder patients and in the intensity of proliferative response, confirming that the decreased response seen in cultures of CCHBV in the presence of autologous serum is probably dependent on a defect in antigen presenting cells or in T lymphocytes.

To support the hypothesis of cellular deficiency we studied the influence of the pool of sera from patients with anti-HBs antibodies, acquired by viral infection, on cellular cultures from chronic carriers. On contrast to what we would expect in the light of theory, i.e., an increase in rHBsAg uptake with the consequent efficiency in antigen presentation process and cellular clonal expansion^{24,25}, none of the chronic carriers patients showed a significant proliferative response.

However, in these cultures, when we increased one hundred times rHBsAg concentration in one nonresponder patient we obtained a proliferative re-

sponse (SI = 2,30) similar to that we had observed in cultures made with autologous sera (SI = 2,23). This may signify that after all, subsequently to the neutralization of the antibodies, the remainder rHBsAg is preferably captured by phagocytosis and not by Fc receptor via.

The results obtained in tests used to evaluate immunological cellular status of patients did not show significant statistical differences among the several groups.

Some studies have shown that IL-2 production by PBMC in chronic HBsAg carriers is substantially reduced compared to normal controls²⁶. Unfortunately, IL-2 in cultures with rHBsAg was below the limit detection of the used test, both in chronic carriers and in patients with anti-HBs antibodies.

In conclusion, our data demonstrated that the impairment of cellular proliferative response in chronic carriers of HBV to rHBsAg is quite complex and could not be attributed to a specific inhibitor factor of cellular immune response suggesting a defect in antigen presenting cells and/or T lymphocytes.

Aknowledgements

We are grateful to Prof. Monjardino from Department of Medicine, St. Mary's Hospital Medical School, London, for critical review of the manuscript. We thank Dr. Luís Borges, Dr. Mário Falcão and Dr. Pires Cabral for permitting us to study patients under their care, and the haemodialysis nursing staff for their assistance during the trial.

This work was supported by a grant from Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (BM982/90-ID). Equipment, materials and almost all the reagents were provided by Lusotransplant - Histocompatibility Centre of Coimbra.

References

1. Tiollais P.; Buendia, M. (1991) Hepatitis B virus. *Scientific American* 4: 48-54.
2. Hoofnagle, J.H.; Shfritz, D.A.; Popper, H. (1987) Chronic Type B hepatitis and «healthy» HBsAg carrier state. *Seminars in Liver Disease* 7 (4): 758-763.
3. Neurath, N.S.; Sproul, H.E. (1990) Detection of receptors for HBV on cells of extrahepatic origin. *Virology* 176: 448-457.
4. Kurz, P.; Koller, H.; Meuer, S.; Hutteroth, T., Buschenfelde, K.H.M. (1986) Impaired cellular immune response in chronic renal failure: evidence for a T-cell defect. *Kidney International* 29: 1209-1214.
5. Watanabe, H.; Matushita, S.; Nobuhiro, K.; Hirayama, K.; Okumura, M.; Sasazuki, T. (1988) Immune suppression gene on HLA-BW54-DR4-DRW53 haplotype controls nonresponsiveness in humans to hepatitis B surface antigen via CD8-positive suppressor T cells. *Human Immunology* 22: 9-17.

6. Watanabe, H.; Makato, O.; Hirayma, K.; Sasazuki, T. (1990) HLA-BW54-DR4-DRW53-DQW4 haplotype controls nonresponsiveness to hepatitis B surface antigen via CD8-positive cells. **Tissue Antigens** 36: 69-74.

7. Nouria-Aria, K.T.; Magrin, S.; Alexander, G.J.M.; Anderson, M.G.; Williams, R.; Eddleston, A.L.W.F. (1988) Abnormal T-cell activation in chronic hepatitis B viral infection: a consequence of monocyte dysfunction? **Immunology** 64: 733-738.

8. Yamauchi, K.; Chiou, S.-S.; Nakanishi, T.; Obata, T. (1988) Suppression of hepatitis B antibody synthesis by factor made by T-cells from chronic hepatitis B carriers. **The Lancet** 1: 324-326.

9. Egea, E.; Iglesias, A.; Salazar, M.; Morimoto, C.; Kruskall, M.S.; Awdeh, Z.; Schlossman, S.F.; Alper, A.; Yunis, E.J. (1991) The cellular basis for lack of antibody response to hepatitis B vaccine in humans. **Journal of Experimental Medicine** 173: 531-538.

10. Kruskall, M.S.; Alper, C.H.; Awdeh, Z.; Yunis, E.J.; Bagley, D.M. (1992) The immune response to hepatitis B vaccine in humans: inheritance patterns in families. **Journal of Experimental Medicine** 175: 495-502.

11. Alper, C.A.; Kruskall, M.S.; Marcus-Bagley, D.; Craven, D.E.; Kats, A.J.; Brink, S.J.; Dienstag, J.L.; Awdeh, Z.; Yunis, J.E. (1989) Genetic prediction of nonresponse to hepatitis B vaccine. **New England Journal of Medicine** 321: 708-712.

12. Sasazuki, T.; Kikuchi, I.; Hirayama, K.; Matsushita, S.; Ohta, N.; Nishimura, Y. (1988) HLA-linked immune suppression in humans. **Immunology** (Suppl. 2): 21-24.

13. Chiou, S.S.; Yamauchi, K.; Nakanishi, T.; Obata, O. (1988) Nature of immunological nonresponsiveness to hepatitis B vaccine in healthy individuals. **Immunology** 64: 554-550.

14. Carmen, W.F.; Hadziyannis, S.; McGarvey, M.J.; Acyne, J.M.R.; Karayiannis, P.; Makris, A.; Thomas, H.C. (1989) Mutation preventing formation of HBeAg in patients with chronic hepatitis B infection. **The Lancet** 2: 588-591.

15. Okamoto, H.; Yotsumoto, S.; Akahane, T.; Myakawa, Y.; Mayumi, C. (1990) Hepatitis B viruses with precore region defects prevail in persistently infected host along with seroconversion to the antibody against antigen. **Journal of Virology** 64 (3): 1298-1303.

16. Tong, S.; Li, J.; Vitviki, L.; Trepco, C. (1990) Active hepatitis B virus replication in the presence of anti-HBe is associated with viral variants containing an inactive pre-C region. **Virology** 176: 596-603.

17. Gunther, S.; Meisel, M.; Reip, A.; Miska, S.; Kruger, D.M.; Will, H. (1992) Frequent and rapid emergence of mutated pre-C sequences in HBV from e- antigen positive carrier who seroconvert to anti-HBe during interferon treatment. **Virology** 187: 271-279.

18. Tran, A.; Kemsdorf, D.; Capel, F.; Housset, C.; Dauguet, C.; Petit, M.A.; Brechot, C. (1991) Emergence and takeover by hepatitis B virus (HBV) with rearrangements in the pre-S/S and pre-C/C genes during chronic HBV infection. **Journal of Virology** 65 (7): 3566-3574.

19. Gerken, G.; Kemsdorf, D.; Capel, F.; Petit, M.A.; Dauguet, C.; Manns, M.P.; Buschenfelde, K.H.M.Z.; Brechot, C. (1991) Hepatitis B defective virus with rearrangements in the preS gene during chronic HBV infection. **Virology** 183: 555-556.

20. Maluish, A.E.; Strong, D.M. (1986) Lymphocyte proliferation. Manual of Clinical and Laboratory Immunology. Rose, N.R.; Friedman, U.; Fahey, J.L., editors. American Society for Microbiology, Washington: 274-281.

21. Peacock, J.S.; Colsky, A.S.; Pinto, V.B. (1990) Lectins and antibodies as tools studying cellular interactions. **Journal of Immunology Methods** 126: 254-257.

22. Serke, S.; Serke, M.; Brudlen, O. (1987) Lymphocyte activation by phytohaemagglutinin and pokeweed mitogen. **Journal of Immunology Methods** 99: 167-172.

23. Jackson, A.L.; Warner, N.L. (1986) Preparation, staining and analysis by flow cytometry of peripheral blood leucocytes. Manual of Clinical and Laboratory Immunology. Rose, N.R.; Friedman, U.; Fahey, J.L., editors. American Society for Microbiology, Washington: 226-235.

24. Celis, E.; Chang, T.W. (1984) Antibodies to HBV surface antigen potentiate the response to human T lymphocyte clones to the same antigen. **Science** 224: 279-299.

25. Celis, E.; Abraham, G.; Miller, R.W. (1987) Modulation of the immunological response to HBV by antibodies. **Hepatology** 7 (3): 563-568.

26. Anastassacos, C.; Alexander, G.J.M.; Woistencroft, R.A.; Avery, J.A.; Portmann, B.C.; Panayi, G.S.; Dumonde, D.C.; Eddleston, A.L.W.F.; Williams, R. (1988) Interleukin-1 and interleukin-2 activity in chronic hepatitis B virus infection. **Gastroenterology** 9: 999-1005.

TABLE I
SEROLOGICAL MARKERS OF STUDIED HAEMODIALYSED GROUPS.

Markers	HBsAg	HBeAg	Anti-HBc	Anti-HBe	Anti-HBs
HD					
CCHBV	+	-	+	+	-
ANTI-HBS Pos	-	-	+	+/-	+
HBV Neg	-	-	-	-	-
VACC	-	-	-	-	+

TABLE II
TABLE REPRESENTATIVE OF PROLIFERATIVE RESPONSE (MEAN OF SI ± SE) OF CELLULAR CULTURES FROM STUDIED GROUPS TO rHBsAg IN PRESENCE OF AUTOLOGOUS SERA, NUMBER OF PATIENTS CONSIDERED RESPONDERS AND AMONG THESE, THOSE WHO USED rHBsAg CONCENTRATIONS ([rHBsAg]) BELOW OR EQUAL 50 PG/ML.

HD (n)	SI (Mean ± SE) (n)	n:[rHBsAg] ≤ 50 pg/ml
CCHBV (n = 9)	2,41 ± 0,14 (n = 6)	n = 2
ANTI-HB s Pos (n = 9)	2,79 ± 0,25 (n = 6)	n = 5
VACC (n = 7)	3,94 ± 0,79 (n = 6)	n = 4
HBV Neg (n = 5)	- (n = 0)	n = 0

TABLE III
MEDIAN (\pm SE) PERCENTAGE OF LYMPHOCYTES EXPRESSING MEMBRANE MARKERS, OBTAINED BY FLOW CYTOMETRY.

HD	CD3	CD4	CD8	sig
CCHBV (n = 8)	76 \pm 2	52 \pm 3	26 \pm 2	10 \pm 2
ANTI-HBS Pos (n = 7)	75 \pm 3	49 \pm 2	28 \pm 2	8 \pm 2
HBV Neg (n = 8)	72 \pm 3	45 \pm 3	27 \pm 2	7 \pm 1

n is the number of patients in each group.

TABLE IV
MEDIAN PERCENTAGE (\pm ES) OF CD25 EXPRESSION ON T-CELL SUBSETS FOLLOWING STIMULATION OF PBMC WITH PHA AND PMA.

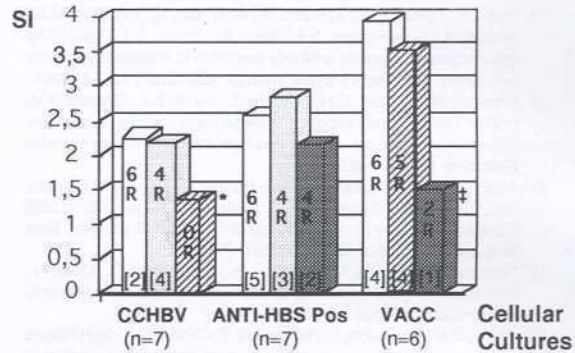
	PHA		PMA	
	CD4/CD25	CD8/CD25	CD4/CD25	CD8/CD25
CCHBV (n = 6)	36 \pm 6	34 \pm 3	34 \pm 3	36 \pm 7
ANTI-HBS Pos (n = 6)	30 \pm 4	34 \pm 7	31 \pm 6	31 \pm 7
HBV Neg (n = 5)	38 \pm 4	37 \pm 3	28 \pm 6	27 \pm 6

n is the number of tested patients in each group.

TABLE V
BLAST TRANSFORMATION (EVALUATED IN MEAN OF SI \pm SE) OF PBMC WITH PHA, PMA AND PWM.

HD	PHA	PMA	PWM
CCHBV (n = 9)	331 \pm 46	60 \pm 9	72 \pm 12
ANTI-HBS Pos (n = 9)	261 \pm 46	48 \pm 11	57 \pm 9
HBV Neg (n = 5)	336 \pm 58	59 \pm 14	66 \pm 17

FIGURE 1
EFFECT OF THE PRESENCE OF POOLED SERA ON rHBsAg-INDUCED LYMPHOCYTE TRANSFORMATION (MEAN SI) IN THE REPRESENTED GROUPS.



Autologous sera (\square), Heterologous sera: pool of sera without HBV-related markers (\square); pool of sera of HD with anti-HBsAg antibodies (\square); pool of sera of chronic carriers of HBV (\blacksquare). Each column presents the number of responders (R) and in brackets the numbers of patients who needed rHBsAg concentrations of 50 pg/ml or below. n is the number of subjects in each group; in each column SI was obtained with all patients (n); cultures were made with autologous sera or heterologous pools of sera.

* ($p = 0,032$) and \ddagger ($p = 0,0006$) versus cultures with autologous sera.

Espondilodiscite brucélica seronegativa

Graça Amaro*
 Manuela Gregó*
 M. Cristina Esteves**

RESUMO

Os autores apresentam o caso de uma mulher de 50 anos, internada por síndrome febril e dor lombo-sagrada. Após a realização de exames complementares comprovou-se a existência de Espondilodiscite L5-S1. Apesar de hemoculturas, mieloculturas e provas serológicas para brucela negativas, o diagnóstico de Espondilodiscite Brucélica foi estabelecido pelo isolamento de *Brucella abortus* obtido por biópsia dirigida por TAC.

Discute-se este raro caso de infecção brucélica serologicamente negativa.

Palavras-chave: Brucelose, Espondilodiscite, Seronegativa.

SUMMARY

The authors present a case of a fifty-year old woman with fever and lumbar pain. After performing radiologic examinations these confirmed L5-S1 spondylodiscitis. Despite the results of blood and bone marrow cultures and serological tests for brucella were all negative, the diagnosis of Brucellar Spondylodiscitis has been established as *Brucella abortus* was isolated by CT scan guided biopsy. This is a rare case of negative serological brucellic infection.

Keywords: Brucellosis, Spondylodiscitis, Negative serologies.

Introdução

A brucelose é uma antropozoonose com distribuição mundial, continuando a ser um grave problema de saúde pública pela elevada morbidade que provoca quer no homem quer nos outros animais^{1,2}.

O seu controlo é difícil passando a sua erradicação pela eliminação dos reservatórios.

São três as espécies de Brucela que mais frequentemente estão envolvidas nesta infecção³:

Brucella mellitensis descrita pela 1.^a vez por Maiston em 1863;

Brucella abortus descrita por Bang em 1897;

Brucella suis descrita por Tram em 1914.

Em 50% dos casos a doença inicia-se após alguns dias de uma forma aguda, nos restantes o quadro pode ter uma instalação insidiosa de algumas semanas a meses.

A forma aguda ou subaguda é a expressão clínica mais comum e normalmente os indivíduos infectados recuperam sem sequelas. Contudo, a doença pode evoluir do estado agudo para o crónico e persistir por muitos anos.

As focalizações da doença acontecem com maior prevalência nas formas crónicas, não sendo de excluir nas formas agudas⁴.

As localizações ósteo-articulares são as mais frequentes mas convém não esquecer que a brucela pode atingir qualquer órgão nomeadamente SNC, coração, pulmão, fígado, baço e aparelho genito-urinário. O diagnóstico desta entidade clínica deve ser feito precocemente apoiado numa forte suspeita clínica e nas provas laboratoriais nomeadamente o serodiagnóstico, sendo confirmado pelo isolamento do agente⁵.

* Internas do Internato Complementar de Medicina Interna.

** Assistente Hospitalar de Medicina Interna.

A resposta imunológica varia dentro das várias espécies de brucela e a negatividade da serologia não exclui doença ou reinfeção.

Caso clínico

M.L.E.S., do sexo feminino de 50 anos, raça caucasiana, doméstica, natural e residente em Marinhais, internada por síndrome febril com dois dias de evolução e dor lombo-sagrada.

Tratava-se de uma mulher aparentemente saudável até à véspera do internamento, altura em que inicia síndrome febril de 40° C, acompanhada de calafrios, sudorese e mialgias intensas. No dia da admissão, associou-se dor localizada à coluna lombo-sagrada e articulação coxo-femural direita, sem irradiação mas com marcada impotência funcional motivando o acamamento.

Nos antecedentes pessoais de salientar a residência em área rural, sem contacto habitual com animais mas consumindo esporadicamente leite e derivados não pasteurizados.

Ao exame objectivo evidenciava-se uma mulher com bom estado geral, com pele e mucosas coradas e hidratadas, febril (T ax. = 38° C), normotensa. Salientava-se na auscultação cardíaca sopro sistólico de grau II/VI no apex; o restante exame torácico e abdominal sem alterações.

O exame ósteo-articular, difícil de avaliar pelas queixas dolorosas, demonstrava dor e impotência funcional marcada ao nível da coluna lombar e charneira lombo-sagrada.

Perante a manutenção de síndrome febril com características inicialmente sépticas de etiologia não esclarecida, foram realizados exames complementares que revelaram: hemograma inicial sem alterações, aumento significativo das proteínas de fase aguda – VS e PCR, moderada alteração da função hepática e exames serológicos negativos (Quadro I).

O Rx de Tórax e o Ecocardiograma foram considerados normais. A prova tuberculínica realizada com 10 U foi negativa.

O Rx da coluna lombo-sagrada, das articulações sacro-ilíacas e coxo-femorais não evidenciavam alterações. As uroculturas, hemoculturas e mielocultura realizadas vieram a revelar-se negativas. As serologias para brucela, realizadas na segunda semana de doença, nomeadamente R. de Huddleson, Reacção de Wright, Rosa de Bengala e a R. de Imunofluorescência foram negativas.

Durante o internamento a doente manteve síndrome febril com calafrios e queixas ósteo-articulares, assistindo-se à instalação de anemia

normocítica normocrómica (Hgb = 8,5 gr/dl), leucopénia (L = 3800 com N = 85%, L = 18%) e maior elevação da VS (140 mm), com normalização das provas de função hepática.

Face à manutenção das queixas dolorosas localizadas à coluna lombo-sagrada, foi efectuada TAC, a qual veio a revelar alterações erosivo-destrutivas das plataformas somáticas adjacentes ao interespaço L5-S1, com redução do espaço discal e componente tecidual heterogéneo, aspecto este compatível com espondilodiscite L5-S1 (fig. 1). Estava-se perante uma doente com síndrome febril com três semanas de evolução e com espondilodiscite L5-S1 cuja etiologia permanecia por esclarecer mas que se admitia ser de origem infecciosa. Foi então realizada biópsia dirigida por TAC, a qual veio a estabelecer o diagnóstico definitivo com o isolamento de *Brucella abortus* no exame cultural.

Foi então iniciada terapêutica dirigida com rifampicina (600 mg/dia) e doxiciclina (200 mg/dia) com paralela instituição de fisioterapia.

Assistiu-se à melhoria clínica gradual com recuperação da marcha e normalização dos valores da hemoglobina e VS.

Foram repetidas serologias para infecção brucélica à terceira e oitava semanas bem como aos três meses (R. de Wright, R. de Bengala, R. de Imunofluorescência), as quais permaneceram negativas.

Concluiu-se estar perante uma infecção a *Brucella abortus* traduzida por Espondilodiscite, que de invulgar apresentou o facto de se manter seronegativa em determinações serológicas seriadas.

Após seis meses de terapêutica, foi realizada TAC lombo-sagrada de controlo que revelou sinais de Espondilodiscite L5-S1 em regressão já com esclerose óssea e sem alterações de partes moles (fig. 2).

Discussão:

A Espondilodiscite brucélica foi descrita pela primeira vez em 1932 por Kulowski e Vinke, sendo rara como afecção isolada^{5,6}.

O envolvimento ósteo-articular da brucelose ocorre entre 20 a 85% dos casos, dependendo a sua localização não só da idade do doente mas também do tipo de brucela⁵.

A espondilite afecta predominantemente a coluna lombar (60-70%) sendo os segmentos mais atingidos L3-L4 e L4-L5⁷. É mais frequente no idoso e em cerca de 2% destes doentes podem desenvolver-se abscessos paravertebrais. Outras complica-

ções descritas incluem cialgias, cruralgias e compressão medular. Estas formas localizadas são normalmente precedidas e/ou acompanhadas de sintomas gerais. Estes são múltiplos e inespecíficos evidenciando-se febre elevada, sudorese, mal-estar geral, anorexia, perda de peso, cefaleias e poliartralgias^{3,4}.

Os achados do exame objectivo dependem do tempo de evolução da doença e incluem: linfadenopatias, hepatoesplenomegália, espondilite e artropatias.

O diagnóstico é estabelecido inequivocamente pelo isolamento do agente⁵.

Dos métodos de isolamento do agente, a hemocultura é o meio mais acessível e menos cruento devendo ser praticada em qualquer fase da doença, inclusivé na crónica. A positividade das hemoculturas é superior na doença aguda, diminuindo nas formas subagudas e crónicas⁶. Outro método utilizado é a mielocultura cuja positividade supera a da hemocultura, podendo isolar o agente mesmo quando a hemocultura é negativa. A sua positividade diminui de modo paralelo à das hemoculturas, em função do tempo de doença. O agente pode ainda ser isolado de qualquer tipo de produto de lesão, de acordo com o quadro clínico. O meio de cultura utilizado é o meio de triptose.

As características próprias desta bactéria, nomeadamente o seu crescimento lento e o facto da incubação ter de ser feita numa atmosfera entre 5 e 10% de CO₂ conduzem a uma elevada taxa de negatividade das hemoculturas, bem como das mieloculturas⁵.

Frequentemente é a serologia que ajuda a estabelecer o diagnóstico, e a sequência de aparecimento dos anticorpos é a mesma que ocorre nas outras doenças infecciosas. Assim, as macroglobulinas 19S (IgM) são as primeiras a aparecer sendo detectáveis oito a dez dias após o início da doença. Elevam-se durante o primeiro mês da fase aguda e persistem por tempo variável. As microglobulinas 7S (IgG) aparecem mais tarde, por volta do 25.º ao 30.º dia após o início da doença, diminuindo rapidamente com a terapêutica instituída verificando-se o seu desaparecimento por volta do 6.º mês. À medida que a doença evolui as IgM declinam, permanecendo em títulos baixos para o resto da vida. A presença de IgG em títulos elevados significa infecção activa ou recente e em títulos baixos contacto prévio com a doença. Verifica-se igualmente que indivíduos com infecção subclínica prévia apresentam no soro IgM em títulos baixos os quais podem persistir durante algum tempo. O mesmo se constata em doentes tratados e sem qualquer sinal de infecção⁸.

As principais técnicas serológicas para brucela incluem:

Reacção de Wright e Reacção de Huddleson

A reacção de Wright é uma reacção de aglutinação em tubo, sendo sobreponível à reacção de aglutinação em lâmina (Huddleson). É a mais precocemente positiva (oito a dez dias) e detecta fundamentalmente anticorpos da classe IgM podendo também detectar anticorpos da classe IgG. É o melhor teste no diagnóstico da brucelose aguda, contudo é frequentemente negativa nas formas subagudas e crónicas¹⁰. Esta reacção é considerada positiva para títulos superiores a 1/80 e diagnóstica para títulos superiores ou iguais a 1/320 ou quando o seu título aumenta para o quádruplo.

No decurso da infecção verifica-se normalmente uma descida lenta e progressiva dos títulos da R. Wright. Contudo, se excepcionalmente isso não se verificar é mandatário uma reobservação clínica detalhada de modo a não se instituir intempestivamente nova terapêutica.

Nesta reacção podem surgir falsos positivos nomeadamente com as seguintes situações:

Infecção por *Yersinia enterocolíca*; Infecção por *Francisella tularensis*; Infecção por *Salmonella*; Infecção por *Yersinia pseudotuberculosis* e *Micobacterium tuberculosis*; Conectivites e doenças neoplásicas; Vacinação anticolérica e antibrucélica.

As reacções de aglutinação nem sempre são positivas principalmente nas formas crónicas, devido à presença de Ac. IgG e imunoglobulinas não aglutináveis e à baixa do título de Ac. IgM¹¹.

A presença de Ac. bloqueantes ou incompletos são IgA ou IgG que podendo aparecer em 3% dos casos mascaram totalmente as aglutininas normais (fenómeno de prozona).

Rosa Bengala

Trata-se de uma reacção rápida de aglutinação em placa usando-se uma suspensão de brucelas em meio tamponado e corado pelo Rosa de Bengala.

Habitualmente é negativa na primeira semana de doença e em 14% dos casos na segunda semana. Esta reacção positiva mais tardiamente que a reacção anterior sendo contudo, mais sensível e específica. Detecta sobretudo anticorpos da classe IgG.

Também aqui podem surgir falsos positivos nomeadamente quando da existência de infecção por *Yersinia enterocolíca*^{12,13}.

Imunofluorescência

Detecta todos os tipos de anticorpos: IgM, IgG e IgA, bem como todos os anticorpos fixados ao microrganismo. É uma técnica complexa, morosa e dispendiosa sendo muito útil nos casos problemáticos e na brucelose crónica.

Esta reacção positiva tardiamente atingindo o seu máximo aos três meses. Pode dar falsos positivos com *Yersinia enterocolitica* e *Tularémia*, mas não com vacinação anticolérica¹⁰.

Teste de Coombs

É uma reacção de aglutinação em que o soro é tratado com antiglobulina humana. Detecta anticorpos aglutinantes e não aglutinantes. É considerado positivo se se registar uma diferença ≥ 4 diluições entre os títulos de aglutinação antes e depois do tratamento com antiglobulina.

A sua positividade significa activação da doença quer seja por recaída ou por passagem à cronicidade. Outras técnicas podem ser utilizadas para a detecção de anticorpos das classes IgG e IgA como sejam: Reacção de Fixação de Complemento, métodos rádioimunológicos (radio immunoessay) e enzimáticos (Elisa)¹⁴.

O caso clínico descrito apresenta uma doente com história epidemiológica sugestiva em que a forte suspeita clínica foi confirmada pelo isolamento do agente com estabelecimento do diagnóstico. Trata-se de um caso pouco frequente de infecção a *Brucella abortus* manifestada por síndrome febril e espondilodiscite que de particular apresentou o facto de se manter serologicamente negativa.

A ausência de resposta imunológica traduzida pelas serologias negativas levanta em qualquer caso de infecção brucélica algumas questões nomeadamente: 1) temporização e seriação das serologias, 2) n.º de diluições do soro, 3) estado imunitário do doente. Relativamente ao primeiro item, as serologias devem ser efectuadas durante o período de seis meses: à entrada, ao primeiro, segundo, terceiro e sexto mês e eventualmente ao nono e décimo segundo meses. Quanto ao número de diluições do soro, por vezes são necessárias diluições muito elevadas sobretudo nas formas crónicas, que podem ir até $1/_{1280}$ para evitar leituras falsamente negativas devido a efeito de prozona que pode ocorrer nos últimos períodos da fase aguda. Saliente-se que nas formas crónicas de doença as reacções de aglutinação são frequentemente negativas, o que se explica quer pela presença de anticorpos IgG e IgA não

aglutináveis quer pela diminuição do título de anticorpos IgM.

O presente caso, com envolvimento focal, comportou-se como brucelose crónica evidenciando uma resposta imune inadequada justificando-se a negatividade serológica por títulos de imunoglobulinas de tal modo baixos que não puderam ser detectados.

Outro teste que futuramente poderá ser usado no diagnóstico de brucelose é o Teste de Proliferação Linfocitária. Sabe-se que a infecção por brucela induz no hospedeiro além da resposta humoral uma resposta celular. Com base nesta última premissa surgem os testes de proliferação linfocitária em que é usado um extracto de antígeno de brucela. Tratam-se de testes que uma vez aferidos poderão contribuir decisivamente para o diagnóstico de brucelose nas formas de apresentação atípicas e/ou na presença de serologias não diagnósticas¹⁰.

Bibliografia:

1. Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis – Planning and Management of Brucellosis Control – Office of Publications, World Health Organization, Geneva, Switzerland 1986.
2. Malhaven, T. – Zoonoses in modern medical practice – Henry Ford Hosp.; Med. J. 1982; 30 (1); 4-6.
3. Lifeso, R.M. et al – Spinal Brucellosis – Journal of Bone and Joint Surgery 1985 – vol. 67 B; n.º 3; 345-351.
4. Bastin, R. et al – Maladies Infectieuses et Parasitaires-Brucellose – Ed. Flammarion Médecine Sciences, Paris, 1972; 68-73.
5. Paul, Hoeprich – Infectious Diseases – New York, Harper and Row, 1977; 1035-1042.
6. Barata, C. et al – Espondilodiscite Brucélica – Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas 1993; Ano 16, n.º 2 (Abril-Junho): 133-139.
7. Bertrand, A. – Brucellose – Encycl Med Chir, Paris, Maladies Infectieuses, 8038 A10, 5-1981; 1-14.
8. Oliveira, J. et al – Diagnóstico Serológico da Brucelose Aguda – Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas 1991; 29-39.
9. Potasman, I. et al – Brucellosis: An Unusual Diagnosis for a Seronegative Patient with Abscesses, Osteomyelitis, and Ulcerative Colitis; Reviews of Infectious Diseases 1991; 13: 1039-42.
10. Léon, Minor, Véron – Bacteriologie Médicale – Ed. Flammarion Médecine Sciences, 2.ª Ed. 1989; 664-666.
11. Ferreira, B. et al – O líquido cefaloraquidiano na Brucelose – Rev. Portuguesa de Doenças Infecciosas 1983; Ano 12 n.º 3: 163-167.
12. Buchanan, T. et al – Brucellosis in the United States – An Abattoir – Associated Disease. Part II – Diagnostic aspects. Medicine (Baltimore), 1974; 53: 415-425.
13. Roux, J. – La serologie de la Brucellose. Met et Hig, 1978; 36: 453-456.
14. Farrell, I.D. et al – Serum Antibody Response in Acute Brucellosis – J. Hyg. (Camb.) 1975; 74: 23-28.
15. Bascoul, S. et al – Stimulating activity of *Brucella* fractions in Human lymphocyte transformation test: Immunology 1976, 31: 717-721.

QUADRO I
EXAMES COMPLEMENTARES

Hemograma	Bioquímica	Bioquímica	Urina	Serologia
HgB = 12,7 g/dl	TGO = 107 U/dl	CK/MB = 571/10 U/l	Tipo II = Normal	Widal Negativo
Htc = 40%	TGP = 148 U/dl	P. Totais = 7,6 g/dl	Uroculturas Negativas	Huddleson Negativo
GV = 4300000/mmc	GGT = 77 U/dl	Albumina = 4,3 g/dl		Weil Felix Negativo
GB = 8400/mmc (N = 97%)	FA = 73 U/dl		HEMOCULTURAS Negativas	VDRL Negativo
VS = 115 mm	LDH = 647 U/dl			Hepatite B, C Negativas
	PCR = 20,5 mg/dl		MELOCULTURA Negativa	HIV 1 e 2 negativos

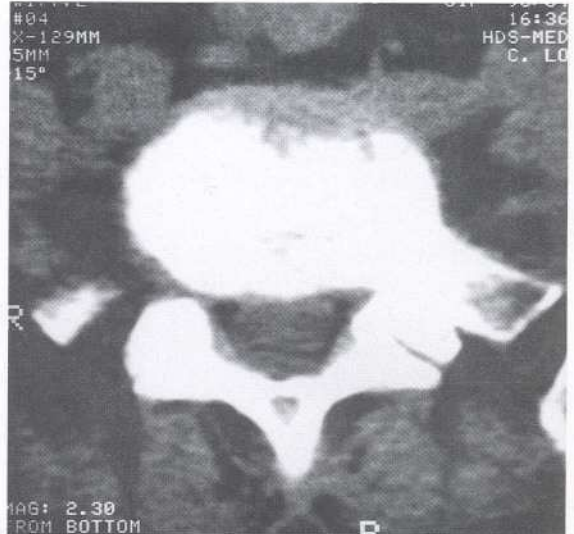
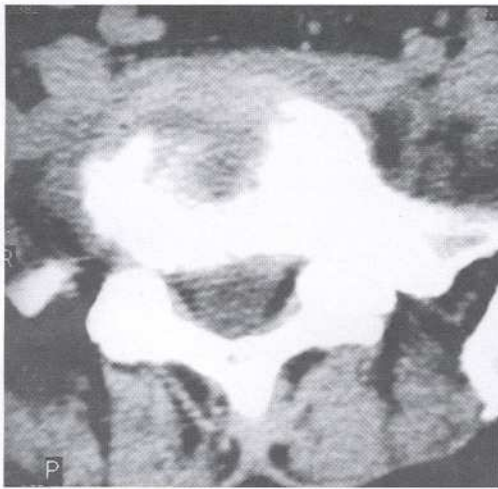


FIGURA 1
TAC DA COLUNA: ESOPONDILODISCITE L5/S1,
COM COMPONENTE TECIDULAR (JANELA DE
OSSO E DE PARTES MOLES)

FIGURA 2
ESOPONDILODISCITE L5/S1 EM REGRESSÃO
(TAC EM JANELA DE OSSO E DE PARTES MO-
LES)

Geografia genética e prevenção da fibrose quística em Portugal

Pedro Loureiro*
 Paula Pacheco*
 Ângela Duarte*
 Cristina Albuquerque*
 João Lavinha*

RESUMO

As heterogeneidades alélica e geográfica da fibrose quística levantam dificuldades importantes ao aconselhamento genético das famílias afectadas, visando ajudá-las a viver e reproduzir-se tão normalmente quanto possível, nomeadamente através da prevenção do aparecimento de novos casos de doença. Neste estudo descreve-se o padrão de distribuição espacial das mutações no gene *CFTR* mais frequentes na população portuguesa e, em particular, da $\Delta F508$ a qual, por si só, representa 43% dos alelos patogénicos. Foi observada uma distribuição diferencial desta última mutação no nosso território: 50-60% no Norte, 20-30% no Centro e 50-70% no Sul.

Palavras-chave: Fibrose quística, geografia genética, prevenção.

SUMMARY

The allelic and geographic heterogeneities of cystic fibrosis raise important difficulties to the genetic counselling of affected families aiming at disease prevention. In this study we have described the spatial distribution pattern of the commonest *CFTR* mutations in the Portuguese population, namely $\Delta F508$, which by itself accounts for 43% of the pathogenic alleles. A differential distribution of this mutation has been observed in the Portuguese territory: 50-60% in the North, 20-30% in the Central Region, and 50-70% in the South.

Keywords: Cystic fibrosis, gene geography, prevention.

Introdução

A fibrose quística (FQ) ou mucoviscidose é, de entre as doenças genéticas graves com um modo de transmissão autossómico recessivo, a mais comum nas populações europeias com uma incidência de 1/2500¹. Na ausência de um estudo epidemiológico a nível nacional, e por analogia com o que se observa em outras populações do Sul da Europa, estima-se que a incidência da FQ em Portugal seja da ordem de 1/4000 recém-nascidos, donde uma prevalência de portadores assintomáticos de 1/32. É, assim, de prever o aparecimento de cerca de 25 novos casos de FQ por ano.

A identificação do gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) veio confirmar que a FQ resulta de mutações num único gene o que não exclui a possibilidade de outro(s) gene(s) e, certamente, factores ambientais poderem ter um efeito modulador no tempo e no modo de apresentação da doença². Do ponto de vista genómico a FQ tem uma elevada heterogeneidade alélica, tendo já sido identificadas mais de 600 mutações presumivelmente patogénicas e 100 variantes normais e polimorfismos³, cuja distribuição apresenta marcadas diferenças interpopulacionais. Este facto tem importantes implicações no delinear da estratégia de prevenção de novos casos da doença a desenvolver junto das diferentes populações-alvo⁴. O objectivo deste estudo foi o conhecimento do padrão de distribuição no território português das mutações no

* Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa

gene *CFTR*, em particular daquelas que, na nossa população, têm uma prevalência superior a 1%, com especial ênfase na mutação mais comum a nível mundial, a $\Delta F508$. Este conhecimento é relevante para o controlo da FQ, através do aconselhamento genético de cada uma das famílias tendo em conta a(s) respectiva(s) região(ões) de origem.

Materiais e métodos

Amostra populacional: A amostra populacional era constituída por 246 doentes portugueses, aparentemente sem laços de parentesco, diagnosticados como sofrendo de FQ em serviços hospitalares especializados do Continente e da Região Autónoma da Madeira. Não entraram nesta amostra 66 indivíduos com suspeita clínica de FQ mas nos quais o curso ulterior da doença ou a discordância genotípica entre irmãos demonstrou não sofrerem daquela patologia. A naturalidade dos portadores dos alelos *CFTR* patogénicos era conhecida em apenas 437 dos 492 alelos analisados (Tabela I). Por serem muito pouco abundantes, os alelos provenientes dos distritos de Viana do Castelo e Braga; Bragança e Vila Real; Guarda, Viseu e Castelo Branco; e Portalegre, Évora, Beja e Setúbal foram, respectivamente, reunidos, sob a designação regional de Minho, Trás-os-Montes, Beira Interior e Alentejo.

Análise do DNA: O DNA de leucócitos do sangue periférico foi extraído pelo método de *salting-out*⁶. A análise da patologia molecular no gene *CFTR* foi feita através de métodos baseados na amplificação enzimática do DNA (PCR), nomeadamente, (i) na detecção de mutações conhecidas, a hibridação molecular com sondas de oligonucleotídeos específicos de alelo (*dot-blot* e ASO), a amplificação enzimática específica de alelo (ARMS) ou a digestão com endonuclease de restrição, e (ii) na procura de mutações desconhecidas, a electroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) seguida de sequenciação da região genómica relevante^{2,6-9}. Sempre que possível, as alterações genéticas encontradas nos doentes foram também pesquisadas nos respectivos progenitores.

Resultados e discussão

A distribuição geográfica das seis mutações mais frequentes (prevalência > 1%) na amostra populacional em estudo está representada na Figura 1. Para além destas mutações, foram já detectadas na nossa população mais 20 alterações na

sequência do gene *CFTR*, cuja raridade as torna irrelevantes para o presente trabalho. Não foi, entretanto identificada nenhuma mutação em 197 alelos FQ, do que resulta uma taxa de detecção de mutações de 55% (referência 10 e novos resultados a serem publicados separadamente). Por seu lado, a distribuição da mutação $\Delta F508$ está descrita na Tabela I e Figura 2. Nota-se uma marcada heterogeneidade distribucional com a frequência da $\Delta F508$ atingindo, no Norte e no Sul, níveis acima da média mais dois erros padrão (> 47%) e, no Centro do País, níveis abaixo da média menos dois erros padrão (< 39%). Calculámos, então, as frequências esperadas dos genótipos com dois, um ou nenhum alelo *CFTR* com a mutação $\Delta F508$, verificando-se um excesso de genótipos $\Delta F508/\Delta F508$ e *outra/outra* (definindo-se como *outra* qualquer mutação, identificada ou não, que não seja $\Delta F508$) e um défice de genótipos $\Delta F508/outra$, relativamente às frequências genotípicas observadas (Tabela II e Figura 3). Estes desvios são estatisticamente significativos ($P > 99,9\%$) no todo nacional e na região Centro mas não o são se se considerarem apenas os doentes em que ambos os progenitores são naturais das regiões Norte ou Sul ($P < 95\%$).

TABELA I
DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA MUTAÇÃO $\Delta F508$ NO TERRITÓRIO PORTUGUÊS DO CONTINENTE E DAS REGIÕES AUTÓNOMAS

Região	Alelos FQ analisados		
	Total N	$\Delta F508$	
		n	n/N \pm erro padrão
Minho ¹	35	17	0,49 \pm 0,08
Trás-os-Montes ²	7	4	0,57 \pm 0,19
Porto	71	21	0,30 \pm 0,05
Beira Interior ³	42	16	0,38 \pm 0,07
Aveiro	22	4	0,18 \pm 0,08
Coimbra	28	8	0,29 \pm 0,09
Leiria	44	22	0,50 \pm 0,08
Santarém	22	10	0,45 \pm 0,11
Lisboa	58	32	0,55 \pm 0,07
Alentejo ⁴	39	19	0,49 \pm 0,08
Faro	20	14	0,70 \pm 0,10
Madeira	37	13	0,35 \pm 0,12
Açores	12	7	0,58 \pm 0,14
Total	437	187	0,43 \pm 0,02

¹ Braga e Viana do Castelo.

² Bragança e Vila Real.

³ Castelo Branco, Guarda e Viseu.

⁴ Beja, Évora, Portalegre e Setúbal.

FIGURA 1
FIBROSE QUÍSTICA NA POPULAÇÃO PORTUGUESA: DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS MUTAÇÕES MAIS COMUNS (Número de alelos FQ estudados: 437. As iniciais representam o nome do distrito e os números entre parêntesis o número de alelos FQ analisados em cada distrito)

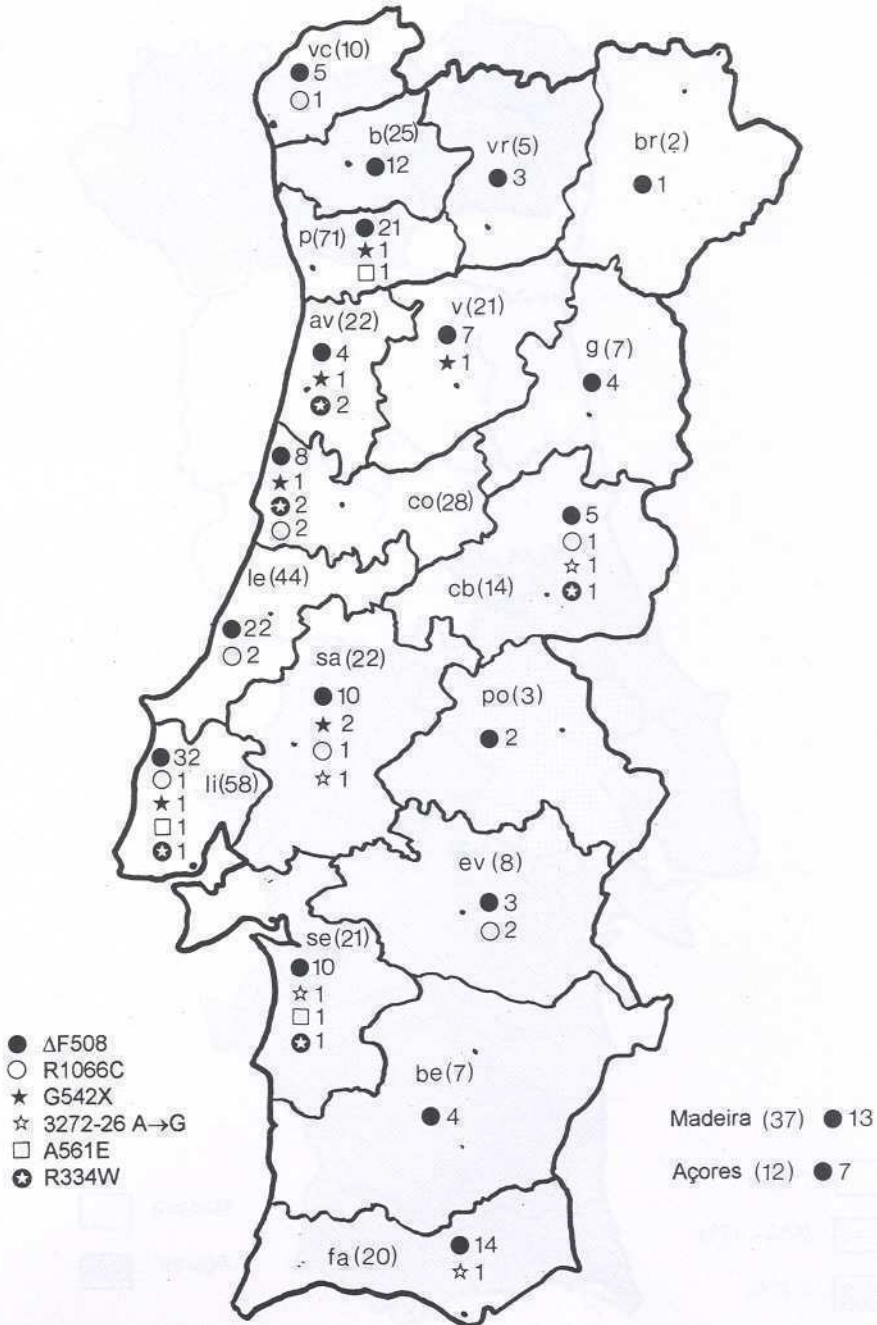


FIGURA 2

FIBROSE QUÍSTICA NA POPULAÇÃO PORTUGUESA: PREVALÊNCIA DA MUTAÇÃO $\Delta F508$ (Número de alelos FQ estudados: 437). As classes de abundância foram determinadas a partir da frequência nacional (0,43) e do erro padrão (0,02) para um intervalo de confiança de 95%: $0,43 \pm 1,96 \times 0,02$

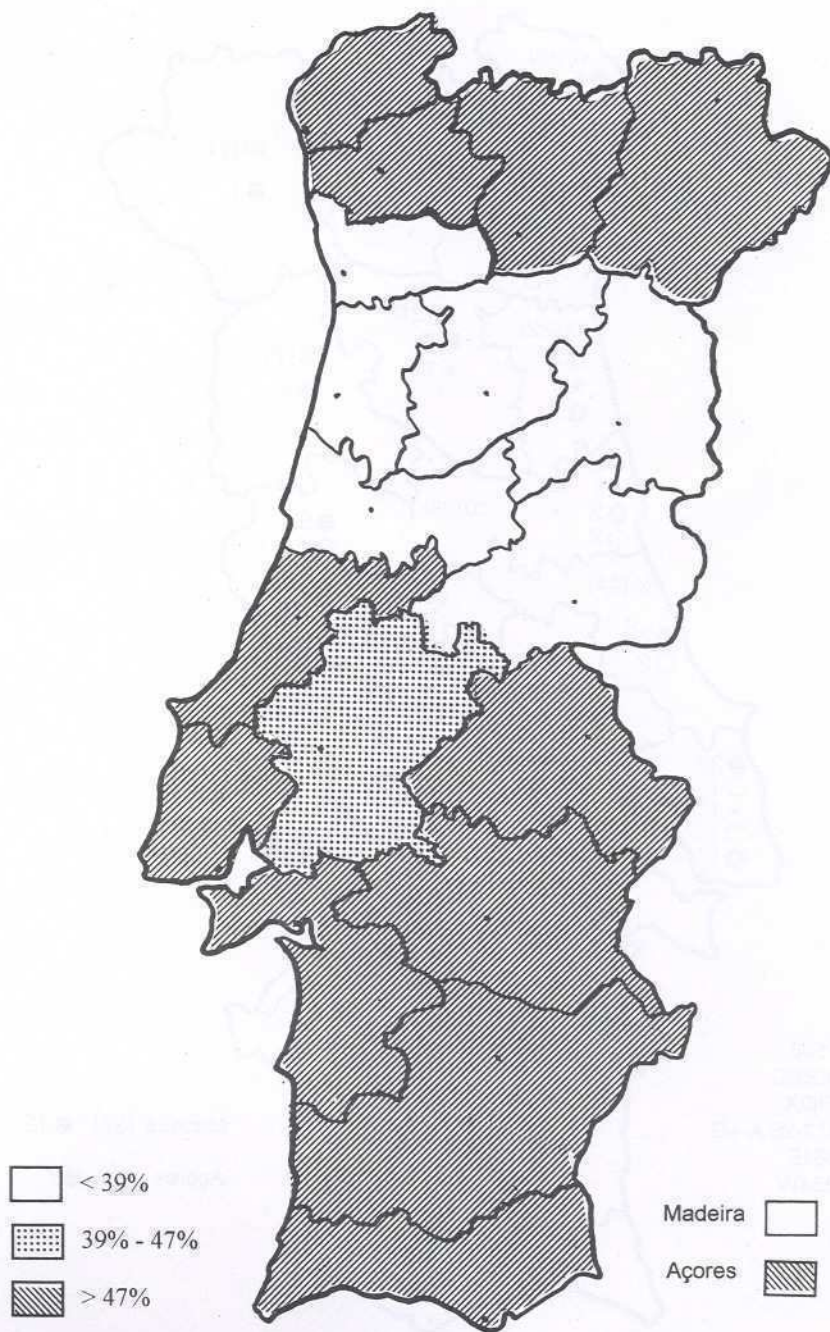


TABELA II
FREQUÊNCIAS OBSERVADAS E ESPERADAS
DOS GENOTIPOS COM DOIS, UM OU NENHUM
ALELO *CFTR* COM A MUTAÇÃO $\Delta F508$

Genótipo	Frequência		N.º de indivíduos	
	esperada*	observada	esperado*	observado
A. Portugal continental e regiões autónomas				
out/out	0,36	0,45	89	111
ΔF /out	0,48	0,30	118	74
$\Delta F/\Delta F$	0,16	0,25	39	61
Total	1,00	1,00	246	246

$\chi^2 = 34,2$ ($P < 0,001$; 1 grau de liberdade)

A1. Região correspondente aos distritos de Coimbra, Castelo Branco, Aveiro, Viseu, Guarda e Porto (frequência da mutação $\Delta F508 < 0,39$)

out/out	0,48	0,57	36	43
ΔF /out	0,43	0,25	33	19
$\Delta F/\Delta F$	0,09	0,18	7	14
Total	1,00	1,00	76	76

$\chi^2 = 14,3$ ($P < 0,001$; 1 grau de liberdade)

A2. Restante território do Continente

out/out	0,20	0,25	20	24
ΔF /out	0,50	0,42	49	41
$\Delta F/\Delta F$	0,30	0,33	29	33
Total	1,00	1,00	98	98

$\chi^2 = 2,4$ ($P > 0,05$; 1 grau de liberdade)

* Admitido que a população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tal facto poderia ficar a dever-se a (i) subdivisão populacional, (ii) sobrevivência diferencial, ou (iii) diferença nos critérios de diagnóstico clínico entre os vários hospitais. Com vista a testar a hipótese de subdivisão populacional, determinámos, na mesma amostra, frequências alélicas e genotípicas para marcadores polimórficos localizados em autossomas (nos cromossomas 7 e 11) e no cromossoma X, não se tendo observado desvios estatisticamente significativos entre frequências observadas e esperadas¹⁰. Para testar a hipótese de sobrevivência diferencial dos indivíduos com os vários genótipos, dividimos a população de doentes por grupos etários e estudámos a repartição etária dos diferentes genótipos, não tendo também encontrado diferenças significativas (dados não apresentados). Finalmente, o resultado da análise do local de diagnóstico dos doentes não é a favor da hipótese de um viés de recrutamento: com efeito, a frequência da mutação $\Delta F508$ em doentes oriundos das várias regiões (elas próprias

definidas a partir da distribuição geográfica da frequência daquela mutação) pertencida à mesma classe de abundância, independentemente do serviço hospitalar onde o diagnóstico fora feito (Tabela III).

TABELA III
RELAÇÃO ENTRE LOCAL DE DIAGNÓSTICO,
ORIGEM GEOGRÁFICA DOS ALELOS *CFTR* E
FREQUÊNCIA DA MUTAÇÃO $\Delta F508$

Local de diagnóstico	Alelos $\Delta F508$ /Total de alelos provenientes de regiões com		
	< 0,39	0,39 a 0,47	> 0,47
	de $\Delta F508^1$	de $\Delta F508^2$	de $\Delta F508^3$
Lisboa	0,40 (19/48)	0,47 (8/17)	0,58 (81/139)
Coimbra	0,21 (10/48)	0,40 (1/ 3)	0,50 (16/ 32)
Porto	0,33 (26/79)	0,50 (1/ 2)	0,44 (17/ 39)
Funchal	0,27 (8/30)	—	—

¹ Aveiro, C. Branco, Coimbra, Évora, Porto, Viseu e Madeira.

² Santarém.

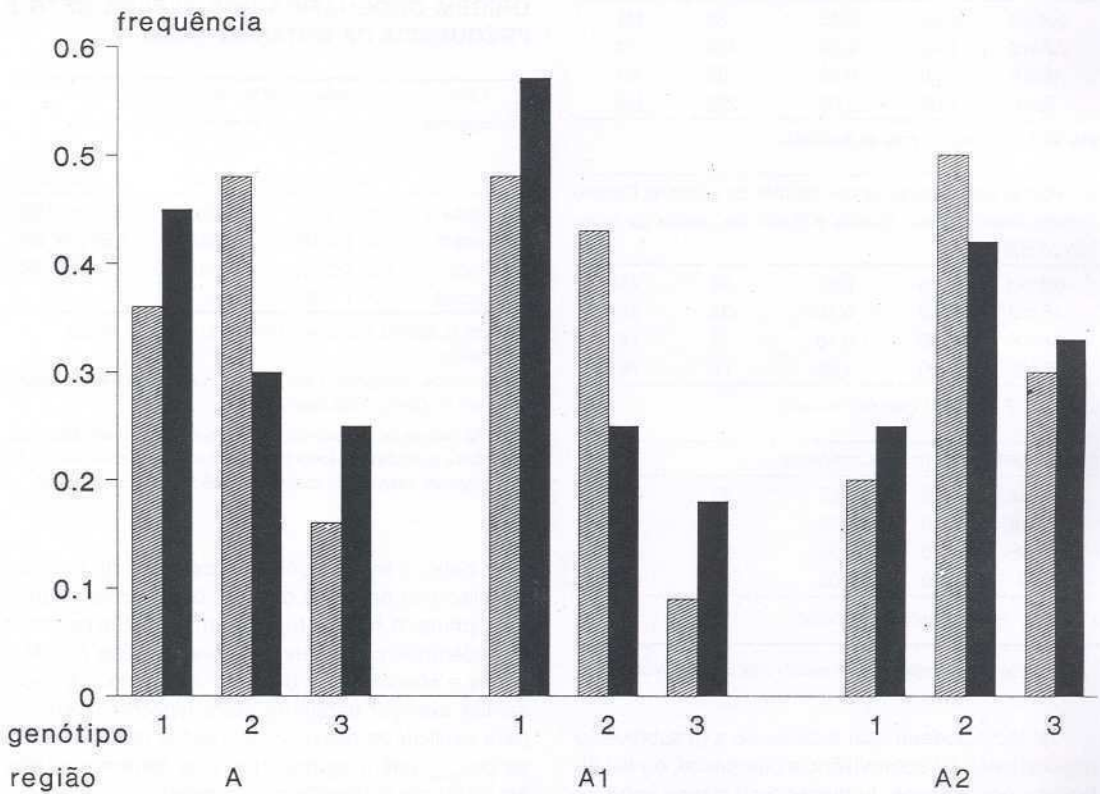
³ Beja, Braga, Bragança, Faro, Guarda, Leiria, Lisboa, Portalegre, Setúbal, V. Castelo, Vila Real e Açores.

Nota: As classes de abundância da mutação $\Delta F508$ foram determinadas a partir da frequência nacional (0,43) e do erro padrão (0,02) para um intervalo de confiança de 95%: $0,43 \pm 1,96 \times 0,02$.

É de notar, a este propósito, a exclusão da amostra populacional de cerca de 20% dos indivíduos que, num primeiro momento, haviam sido clinicamente considerados como tendo fibrose quística (Cf. Materiais e Métodos). Embora, de momento, não possamos avançar nenhuma outra hipótese verosímil para explicar os desvios observados nas frequências genotípicas, julgamos que eles devem ser tidos em conta no aconselhamento genético dos familiares dos doentes FQ, em especial na valorização de um resultado negativo no teste de portador de FQ no âmbito de um rastreio «em cascata»^{11,12}. No entanto, o acompanhamento da evolução clínica dos doentes e o aumento da taxa de detecção de mutações FQ contribuirão, a médio prazo, para o esclarecimento desta questão.

Em conclusão, os dados por nós aqui revistos e analisados apontam para uma taxa global nacional de detecção de mutações no gene *CFTR* da ordem de 55%. A mutação mais frequente ($\Delta F508$) representa 40-45% do total dos alelos FQ, apresentando uma distribuição diferencial no território: 50-60% no Norte, 20-30% no Centro e 50-70% no Sul. As restantes mutações com uma prevalência superior a 1% acrescentam cerca de 7% sem aparentes heterogeneidades inter-regionais. Estes valores, em conjugação com a

FIGURA 3
DESVIOS ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS ESPERADAS (coluna a cinzento) e observadas (coluna a negro) EM FUNÇÃO DA ORIGEM GEOGRÁFICA DOS ALELOS FQ: A, Todo o território; A1, Região «centro»; A2, Restante território do Continente. OS DESVIOS SÃO SIGNIFICATIVOS EM A E A1, MAS NÃO EM A2. GENOTIPOS: 1, *outra/outra*; 2, Δ F508/*outra*; 3, Δ F508/ Δ F508



prevalência estimada de portadores assintomáticos de FQ (1/32), proporcionam aos conselheiros genéticos um meio de calcular o risco de descendência com FQ, em função da naturalidade dos cônjuges, após a realização de um teste de portador aos membros de um casal com risco *a priori* médio ou elevado.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos médicos assistentes dos doentes com FQ a referência dos mesmos, bem como a recolha dos dados de carácter clínico e

epidemiológico sem os quais a realização deste trabalho teria sido impossível. Este estudo foi parcialmente financiado pelo contrato e investigação JNICT PBIC/C/SAU1587/92.

Bibliografia

1. Welsh, M.J.; Tsui, L.T.; Boat, T.F.; Beaudet, A.L. — Cystic fibrosis. In Scriver, C.L.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. (eds) *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 7th ed. New York: McGraw-Hill, pp. 3799-3876, 1995.
2. Kerem, B.S.; Rommens, J.M.; Buchanan, J.A.; Markiewicz, D.; Cox, T.K.; Chakravarti, A.; Buchwald, M.; Tsui, L.T. — Identification

- of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. **Science**, 245, 1989, 1073-1080.
3. The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium – **Newsletter** 68 de 23 de Maio, 1996.
 4. The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium – Population variation of common cystic fibrosis mutations. **Hum Mut**, 4, 1994, 167-177.
 5. Miller, S.A.; Dykes, D.D.; Polesky, H.F. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res**, 16, 1988, 1215.
 6. Ferrie, R.M.; Schwarz, M.J.; Robertson, N.H.; Vaudin, S.; Super, M.; Malone, G.; Little S. Development, multiplexing, and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene. **Am J Hum Genet**, 51, 1992, 251-262.
 7. Gasparini, P.; Nunes, V.; Savoia, A.; Dognini, M.; Morral, N.; Gaona, A.; Bonizzato, A.; Chillón, M.; Sangiuolo, F.; Novelli, G.; Dallapiccola, B.; Pignatti, P.F.; Estivill, X. The search of Southern European cystic fibrosis mutations: Identification of two new mutations, four variants, and intron sequences. **Genomics**, 10, 1991, 193-200.
 8. Fanen, P.; Gahnem, N.; Vidaud, M.; Besmond, C.; Martin, J.; Costes, B.; Plassa, F.; Goossens, M. Molecular characterization of cystic fibrosis: 16 novel mutations identified by analysis of the whole cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) coding regions and splice site junctions. **Genomics**, 13, 1992, 770-776.
 9. Dodé, C.; Rochette, J.; Krishnamoorthy, R. Locus assignment of human α -globin mutations by selective amplification and direct sequencing. **Br J Haematol** 76, 1990, 275-281.
 10. Pacheco, P.; Duarte, A.; Albuquerque, C.; Lavinha, J. Cystic fibrosis molecular epidemiology and prevention in the Portuguese population (resumo). **19th European Cystic Fibrosis Conference**, Paris, 1994.
 11. Super, M.; Schwarz, M.J.; Malone, G.; Roberts, T.; Haworth, A.; Dermody, G. Active cascade testing for carriers of cystic fibrosis gene. **Br Med J** 308, 1994, 1462-1467.
 12. Pacheco, P.; Duarte, A.; Loureiro, P.; Lavinha, J. Rastreio de portadores de fibrose quística (resumo). **XXX Jornadas Luso-Espanholas de Genética**, Lisboa, 1995.

Determinação de *Listeria sp* em queijos de pasta mole de produção nacional: comparação de métodos

Maria Isabel da Silva Santos*

Cristina Belo Correia*

Maria do Rosário Novais*

Paulo Jorge Nogueira**

RESUMO

Num trabalho anterior realizado no Laboratório em queijos de pasta mole, detectou-se uma percentagem de positividade, para *L. monocytogenes*, inferior à referida em outros países, tendo-se formulado a hipótese deste resultado ser devido à utilização de métodos que incluíam meios de cultura pouco inibidores da flora competitiva.

O facto de terem surgido, posteriormente, meios de cultura mais inibidores, levou-nos a efectuar um novo estudo sobre o mesmo tipo de queijos, com o objectivo de determinar a percentagem de positividade de *Listeria monocytogenes* avaliando comparativamente 3 métodos de pesquisa.

Efectuou-se este trabalho de estudo em 65 amostras de queijos de pasta mole de produção nacional. Detectaram-se 17 amostras positivas, *L. monocytogenes* em 8 amostras (47%) e *L. monocytogenes* associada a outras espécies de *Listeria* em 9 amostras (53%). Estas percentagens, mais elevadas do que as obtidas anteriormente, estão de acordo com o referido em outros trabalhos internacionais.

Este estudo permitiu ainda alertar para os riscos que podem advir do consumo deste tipo de produtos.

Palavras-chave: Queijos pasta mole. *Listeria sp*. Comparação métodos.

SUMMARY

In a previous study carried out in our Laboratory on soft cheeses, we detected a lower percentage of *Listeria monocytogenes* than the one found in other studies. We considered the possibility that this result was due to the use of methods which included culture media with reduced inhibitory activity for competitive flora.

Since new culture media with more inhibitory activity became available we decided to perform another study on the same type of cheeses, in order to evaluate 3 different methods which are appropriate for the detection of *L. monocytogenes*.

A total of 65 samples of different soft cheeses produced in this country was studied. There were 17 positive samples in which 8 samples (47%) *Listeria monocytogenes* was the sole *Listeria* species isolated, and in 9 samples (53%) *Listeria monocytogenes* was associated to other *Listeria sp*.

The results of this study could be a warning for the risks associated to the consumption of this type of cheese.

Keywords: Soft cheeses. *Listeria sp*. Methods evaluation.

1. Introdução

A *Listeria monocytogenes* começou, a partir do final dos anos 80, a ser encarada como uma bactéria patogénica de origem alimentar. Ao longo dos últimos anos têm sido publicados numerosos trabalhos, os quais relacionam o consumo de alimentos con-

tendo esta espécie bacteriana com a ocorrência de surtos e/ou casos de listeriose¹, continuando, assim, a *Listeria monocytogenes* a despertar o interesse dos microbiologistas alimentares a nível mundial.

Esta bactéria pode encontrar-se numa grande variedade de alimentos, de entre os quais os produtos lácteos e em particular o queijo, têm sido exaustivamente estudados².

Diversos estudos revelaram que a *L. monocytogenes* tem a capacidade de sobreviver ao processamento e/ou condições de armazenamento,

* Laboratório de Microbiologia dos Alimentos do Instituto Nacional de Saúde.

** Centro de Epidemiologia e Bioestatística do Instituto Nacional de Saúde.

em diferentes tipos de queijo. Verificou-se que nos queijos que são muito manipulados durante o processo de fabrico, quer nos de pasta mole, quer nos pouco ácidos, a sua incidência é maior, sendo também mais elevado o teor de microrganismos presentes, podendo atingir níveis da ordem de 10^7 ufc/g³.

Num estudo anterior realizado no nosso Laboratório, procedeu-se à pesquisa de *L. monocytogenes* em diversos tipos de queijos de pasta mole de produção nacional⁴, tendo sido detectada a sua presença em 4,7% das amostras analisadas. Esta percentagem é bastante inferior aos resultados publicados em outros trabalhos referentes a este tipo de produto^{5,6}. Este valor pode ser explicado, em parte, por uma abundante flora contaminante nos queijos de fabrico nacional e também pela utilização de meios de cultura de reduzida acção inibidora^{4,7,8}.

Em Portugal existem poucos dados disponíveis relativos à contaminação dos queijos de pasta mole por *L. monocytogenes*. Todavia, sabe-se que este produto constitui um substrato adequado ao crescimento desta bactéria, quer devido ao aw, pH, e nutrientes disponíveis, quer devido ao seu longo armazenamento a temperaturas de refrigeração.

Assim, os objectivos do presente trabalho são a determinação da percentagem de positividade de *L. monocytogenes* em algumas amostras de queijos de pasta mole de produção nacional e a avaliação comparativa de 3 métodos de pesquisa, os quais preconizam meios de cultura mais inibidores do que os utilizados no trabalho anterior⁴.

Com a finalidade de encurtar o tempo de resposta têm sido desenvolvidos numerosos métodos para detectar e/ou isolar *L. monocytogenes* a partir de um alimento. Em alguns destes métodos demonstrou-se a vantagem de, no caso de produtos com elevada flora contaminante, recorrer a duas etapas de enriquecimento: um 1.º enriquecimento sem inibidores seguido de um 2.º enriquecimento usando o mesmo meio mas com inibidores, ou um 1.º enriquecimento em meio selectivo seguido de um 2.º enriquecimento no mesmo meio^{1,9,10,11,12,13,14}.

Isso mesmo foi sugerido para os produtos lácteos¹⁰, nos quais o isolamento de *L. monocytogenes*, de amostras com uma flora contaminante abundante, é também favorecido pelo uso de um método com duas etapas de enriquecimento.

Contudo, de um modo geral, nenhum método de enriquecimento e/ou meio de isolamento se têm revelado adequados para todos os tipos de alimentos estudados¹⁵. Além disso, como uma pesquisa de *Listeria* negativa demora cerca de 4 dias e uma pesquisa de *Listeria* positiva demora 6-7 dias, surgiram recentemente novos tipos de ensaios comerciali-

zados, os denominados métodos rápidos, visando superar esta demora. Este tipo de métodos possibilitam, essencialmente, uma diminuição no tempo total de análise, conduzindo a uma obtenção mais rápida de resultados analíticos.

Os dois métodos convencionais utilizados neste trabalho, Métodos I e II, foram seleccionados por se terem revelado os mais eficazes para a pesquisa de *L. monocytogenes* em queijos, no ensaio interlaboratorial BCR-FOOD «Additional *Listeria* Trial»¹⁶, no qual o Laboratório de Microbiologia dos Alimentos participou. O método rápido escolhido, Método III, é o ensaio de pesquisa de *Listeria* da Gene-Trak Systems, recomendado pela Food and Drug Administration para o rastreio do género *Listeria* nos alimentos¹⁷.

2. Material e métodos

2.1. Estirpes

As estirpes utilizadas neste trabalho foram as seguintes:

- *Listeria monocytogenes* - Scott A F 4642
- *Listeria innocua* - NCTC 11288
- *Listeria ivanovii* - NCTC 11007
- *Staphylococcus aureus* β hemolítico - CIP 5710
- *Rhodococcus equi* - CIP 5869

Estas estirpes foram mantidas em meio Tryptic Soy Agar (TSA) (Difco - 0369-01-4), distribuído em tubos com rampa inclinada e conservados no frigorífico a uma temperatura de cerca de 4° C. Posteriormente as estirpes foram repicadas para meio de Brain Heart Infusion (Difco - 0037-01-6) e incubadas a 37° C +/-1° C durante 24 h, sendo posteriormente semeadas com ansa pela técnica das estrias, em meio de TSA distribuído em placas.

2.2. Amostras

Estudou-se a presença de *Listeria sp*, com destaque para a espécie *Listeria monocytogenes*, em 65 amostras de queijo de pasta mole de produção nacional, adquiridos nas condições habituais de compra, em diversos supermercados da área da Grande Lisboa, ao longo de um período de cerca de um ano.

As amostras adquiridas dividiram-se em:

- queijo fresco (10)
- queijo de Azeitão (7)

- queijo da Serra da Estrela (15)
- queijo das Serras do Rabaçal (8)
- queijo de Castelo Branco (8)
- queijo tipo Camembert (9)
- queijo tipo «pur chèvre» (8)

Cada amostra de queijo embalada individualmente foi constituída por um queijo inteiro, quando possível, ou por 150 g no mínimo, à excepção do queijo fresco em que cada amostra era constituída por duas unidades. Posteriormente, as amostras foram transportadas ao Laboratório de Microbiologia dos Alimentos e mantidas a uma temperatura de cerca de 4° C até ao momento da realização da análise. Quando não foi possível efectuar a análise no próprio dia, as amostras foram armazenadas à mesma temperatura, durante um período máximo de 72 h.

Efectuou-se a colheita das tomas para análise com pinça e bisturi esterilizados, tendo o cuidado de retirar porções, quer da superfície, quer do interior da amostra. Seguidamente procedeu-se à homogeneização em almofariz e pesaram-se 3 tomas de 25 g cada (a serem utilizadas respectivamente nos Métodos I, II, III) para 3 sacos de plástico estéreis apropriados para o homogeneizador Stomacher 400.

Todas as amostras de queijo foram analisadas em paralelo por dois métodos de pesquisa convencionais, com duas etapas de enriquecimento (Métodos I e II) e um método rápido de hibridação de ácidos nucleicos (Método III).

2.3. Métodos laboratoriais

2.3.1. Método I

Inocularam-se 25 g da amostra em 225 ml de meio de pré-enriquecimento não selectivo, *Listeria Enrichment Broth Base* (LEB, Oxoid, CM 862). Após homogeneização no Stomacher 400, durante 4 min., incubou-se a 30° +/-1° C durante 16-20 h¹⁶. Após incubação, a partir do meio de enriquecimento transferiu-se uma subcultura de 0,1 ml para um tubo contendo 10 ml de meio de enriquecimento LEB adicionado de *Listeria Selective Enrichment Supplement* (Oxoid, SR 141). Este enriquecimento foi incubado a 30° +/-1° C e efectuaram-se a partir deste 3 sementeiras diferentes com ansa, pela técnica das estrias, para cada uma de 5 placas de meio de Oxford Agar (Oxoid, CM 856)¹⁸ após 24 h, 48 h, e 1 semana de incubação respectivamente. As placas foram incubadas a 37° +/-1° C durante 24 h, em condições de aerobiose, após o que se observou se

havia ou não presença de colónias suspeitas. Nos casos em que não se observou crescimento, as placas foram reincubadas nas mesmas condições e de novo observadas. As colónias típicas de *Listeria* apresentam-se neste meio, pequenas e circulares, com uma zona negra à volta devida à hidrólise da esclulina. Sempre que as placas apresentaram colónias com estas características, pelo menos 2 colónias por placa foram estudadas. Após reisolamento em meio de TSA as colónias foram observadas à lupa utilizando o Sistema de Transluminância de Henry¹⁹ mas com um espelho côncavo. A partir das culturas que na observação à lupa se apresentaram com um brilho azul acinzentado efectuaram-se os seguintes testes⁴: coloração de Gram, prova da catalase, mobilidade a 22° C e produção de ácidos a partir dos glúcidos D-xilose, manitol e ramnose.

A prova da mobilidade foi efectuada em cultura por picada central, com fio recto, em gelose a 5% (Peptona 10 g (Difco - 0118-01-8), «Lab-lemco» Powder 5 g (Oxoid, L29), cloreto sódio 3 g (Merck - 1-06400), Agar 5 g (Difco - 0140-01), água destilada 1000 ml) e após 10 dias de incubação a 22 ± 1° C observou-se o aspecto característico de crescimento em «guarda-chuva»²⁰.

Nas culturas das estirpes, cujos testes bioquímicos permitiram suspeitar de *L. monocytogenes*, efectuou-se o teste de Camp⁴ e o teste de hemólise²¹.

Identificaram-se como *L. monocytogenes* as estirpes provenientes de colónias em que se observaram pequenos bacilos positivos ao Gram, com prova da catalase positiva, móveis a 22° C com crescimento em «guarda-chuva», fermentadoras da ramnose, não fermentadoras da xilose e do manitol, hemolíticas sobre os glóbulos de carneiro e Teste de Camp positivo.

2.3.2. Método II

Inocularam-se 25 g da amostra em 225 ml de meio de enriquecimento, LEB (Oxoid, CM 862) adicionado de *Listeria Selective Enrichment Supplement* (Oxoid, SR 141). Após homogeneização no Stomacher 400 durante 4 min., incubou-se a 30° +/-1° C durante 24 h¹⁶. Após incubação, a partir do meio de enriquecimento transferiu-se uma subcultura de 0,1 ml para um tubo contendo 10 ml do mesmo meio.

Os procedimentos de isolamento, identificação bioquímica e confirmação da presença de *L. monocytogenes* foram semelhantes aos utilizados no Método I.

2.3.3. Método III

Este método é um ensaio de hibridação de ácidos nucleicos comercializado pela Gene-Trak Systems, 31 New York Avenue, Framingham, M.A., 01701 USA.

Este ensaio envolve três etapas: enriquecimento da amostra em meio selectivo, sementeira em superfície em meio selectivo sólido e execução do ensaio de hibridação, numa suspensão da cultura desenvolvida no meio selectivo.

Inocularam-se 25 g da amostra em 225 ml do meio de enriquecimento utilizado no Método II.

Após incubação procedeu-se a uma homogeneização vigorosa do meio de enriquecimento no Vortex – Genie TM (Scientific Industries, Inc.) e semeou-se 0,5 ml com auxílio de um espalhador de vidro estéril, em placa de meio de Oxford Agar. Esta placa foi incubada a 37° +/- 1° C durante 24 h. Terminado o período de incubação retirou-se toda a cultura presente na superfície do meio, com o auxílio de uma zaragatoa estéril, efectuou-se uma suspensão num tubo contendo 1 ml de solução tampão PBS (Monohidrogenofosfato de sódio dihidratado – 8,98 g (Merck 6580), Dihidrogenofosfato de sódio monohidratado – 2,71 g (Merck 6346), cloreto de sódio puro – 8,5 g (Merck 6400), água destilada 1000 ml) libertando o máximo possível de líquido da zaragatoa e agitando fortemente no Vortex, durante 5 s.

O ensaio Gene-Trak efectuou-se a partir de uma alíquota de 0,5 ml desta suspensão. O volume restante foi guardado, a uma temperatura de cerca de 4° C, para o caso de ser necessário efectuar uma confirmação posterior das amostras positivas utilizando métodos convencionais.

A partir desta suspensão efectuou-se a pesquisa de *Listeria* através do ensaio colorimétrico da Gene-Trak. Todos os reagentes necessários, assim como o equipamento e soluções padrão, foram fornecidos pelo fabricante e os procedimentos efectuaram-se de acordo com o protocolo analítico incluído no kit. Este protocolo preconiza: 1) a adição sequencial de soluções para lise bacteriana, desnaturação dos ácidos nucleicos e neutralização da amostra; 2) a adição da solução de pré-hibridação; 3) a adição da solução de hibridação e da sonda de DNA; 4) um período de incubação para que se dê a captura do microrganismo alvo (*Listeria*) eventualmente presente na amostra; 5) a leitura final da densidade óptica (DO) a 450 nm no espectrofotómetro incluído no kit.

Os ensaios com um valor de absorvância superior ao valor limite estabelecido pelo fabricante (DO

do controlo negativo + 0,1) foram considerados presuntivamente positivos para a presença de *Listeria*. Estes resultados de hibridação, presuntivamente positivos, foram posteriormente confirmados através de métodos convencionais. Procedeu-se a esta confirmação efectuando isolamentos a partir do volume restante da suspensão inicial em meio de Oxford Agar. Todas as etapas subsequentes necessárias à identificação de *Listeria* foram executadas seguindo os procedimentos utilizados nos Métodos I e II.

2.4. Métodos estatísticos

Os dados obtidos neste estudo foram enviados ao Centro de Epidemiologia e Bioestatística (CEB) para que fizesse a análise estatística da comparação dos três métodos descritos anteriormente. Os resultados são apresentados em tabelas 2x2, referentes à presença ou ausência de *L. monocytogenes* para cada dois dos métodos utilizados (Tabela I). Parece ser então pertinente fazer a análise da concordância entre os métodos.

De forma empírica, existem dois tipos distintos de concordância:

- uma em que a verdade é conhecida e se justificam o uso de estatísticas como a sensibilidade, a especificidade e os valores preditivos;
- outra em que a verdade não é conhecida e se tem de usar um contexto interobservacional, onde fazem sentido a estatística Kappa de Cohen e as estatísticas do tipo Kappa.

Historicamente, a análise de concordância num contexto interobservacional é feita utilizando a estatística Kappa de Cohen e estatísticas do tipo Kappa. Estas estatísticas foram originalmente propostas para quantificar níveis de concordância. No entanto, o procedimento que os aspectos distribucionais impõem, apenas nos permite concluir se a concordância observada está para além do esperado por acaso ou não.

Nogueira, num trabalho anterior²², estudou os aspectos distribucionais do Kappa de Cohen, onde ressaltou que o nível de Kappa observado depende do número de objectos, itens ou sujeitos classificados, questionando as tabelas comumente utilizadas para a interpretação dos níveis de Kappa usados.

Muito brevemente, no IV Congresso da Sociedade Portuguesa de Estatística, será apresentada uma metodologia baseada no Kappa de Cohen que

visa a quantificação de um nível de concordância. É essa metodologia que é aqui utilizada.

De forma sucinta, esta metodologia assenta na ideia de que o Kappa de Cohen observado depende do número de objectos, items ou sujeitos classificados e ainda de um nível conjunto de classificação, digamos θ . Ou seja, assintoticamente, a distribuição do Kappa de Cohen tem um valor médio que é uma função de θ e uma variância que é uma função de θ e N (número de objectos, items ou sujeitos), nomeadamente:

$$K \cap \text{Normal} \left(-1 + 2\theta; \frac{4\theta(1-\theta)}{N + 4\theta(1-\theta)} \right).$$

O objectivo reside, então, em encontrar o θ de maior evidência, ou menos susceptível de ser rejeitado.

3. Resultados e discussão

Neste estudo isolámos *L. monocytogenes*, através de pelo menos um dos três métodos de pesquisa, em 17 amostras, o que representa 26,2% do total de queijos de pasta mole analisados. Na Figura 1 ilustra-se a distribuição das amostras positivas por variedades de queijo.

De salientar que foi no queijo Serra da Estrela, por muitos considerado como o rei dos queijos portugueses, que se obteve um maior número de resultados positivos, 12 amostras, o que corresponde a 70,5% do total de queijos com *L. monocytogenes*. O queijo Serra da Estrela é um queijo de fabrico artesanal, produzido a partir de leite de ovelha cru, proveniente da Região Demarcada para esta produção. É o queijo português de maior reputação, o qual pode ser encontrado à venda no mercado, certificado e não certificado. O queijo certificado possui uma denominação de origem controlada, a qual se encontra regulamentada desde 1985 pelo Decreto-Lei 42/85 de 5 de Julho, devendo satisfazer as condições estabelecidas na NP-1922 (1984) e ser devidamente creditado pela entidade certificadora. Neste estudo analisaram-se 8 amostras de queijo da Serra da Estrela certificado e 7 amostras de queijo da Serra da Estrela não certificado. Verificou-se que, para os queijos não certificados se detectou *L. monocytogenes* na totalidade das amostras, enquanto no queijo certificado se detectou *L. monocytogenes* em 5 amostras. Estes valores não deixam de surpreender, na medida em que, tratando-se de um produto certificado deveria estar isento de microrganismos patogénicos.

Estudaram-se 668 estirpes do género *Listeria* através das provas de identificação bioquímica já referidas anteriormente neste trabalho. Observando a Tabela II verifica-se que destas 668 estirpes, 382 (57,2%) foram identificadas como *L. monocytogenes*, 180 (27,0%) como *L. innocua* e as restantes 106 (15,8%) como *Listeria sp.* Esta distribuição, com domínio da espécie *Listeria monocytogenes*, está de acordo com os resultados obtidos em outros trabalhos publicados sobre queijos²³.

No queijo Serra da Estrela estudaram-se e identificaram-se 308 estirpes de *L. monocytogenes*, 40 de *L. innocua* e 30 de *Listeria sp.* Relativamente ao queijo de Castelo Branco a proporção é completamente diferente: 57 de *L. innocua*, 3 de *L. monocytogenes* e 2 de *Listeria sp.*

Para as variedades queijo de Azeitão e queijo fresco, a única espécie de *Listeria* que se isolou foi a *L. innocua*.

É de salientar que o queijo fresco analisado, foi fabricado com leite de vaca pasteurizado, e que a presença de *Listeria* no produto final pode dever-se a uma pasteurização incorrecta^{24,25} do leite ou, mais provavelmente, a uma contaminação pós-tratamento^{24,26}.

Na Tabela III pode observar-se o número de amostras positivas, presença de *L. monocytogenes*, detectadas por cada um dos métodos de pesquisa utilizados I, II e III. Se tivéssemos utilizado qualquer um dos métodos, isoladamente, teríamos obtido os seguintes resultados: 12 amostras positivas pelo Método I, 11 amostras positivas pelo Método II e 5 amostras positivas pelo Método III. Estes valores indicam que nenhum dos três métodos utilizados teve, por si só, a capacidade de detectar a presença de *Listeria monocytogenes* em todas as 17 amostras positivas, tendo-se obtido resultados positivos, em simultâneo através dos três métodos, apenas em três das amostras o que corresponde a 4,6% do total de queijos analisados (Tabela IV). Contudo não se verificaram diferenças substanciais na capacidade de detecção dos métodos convencionais (I e II), uma vez que o número de amostras positivas detectado é praticamente igual. No entanto, é de salientar que este valor é consideravelmente superior ao detectado pelo método de hibridação do DNA (III). Ainda relativamente aos Métodos I e II e observando as Tabelas V e VI, verifica-se que para ambos os métodos foi após 24 h de incubação que se obteve um maior número de amostras positivas (80%) e que às 48 h apenas se detectou mais 1 amostra positiva (6,7%). Este resultado foi também verificado num estudo efectuado por Warburton et al.²⁷. O prolongamento do tempo de incubação até uma semana

permitiu o rastreio de mais 2 amostras positivas (13,3%) através do Método I, pelo que se considera que a incubação até uma semana é importante para a recuperação de *L. monocytogenes*.

Relativamente ao Método III é de realçar que, apesar de se terem detectado inicialmente 21 amostras positivas, apenas se confirmou a presença de *L. monocytogenes* em 5 (23,8%) destas amostras. No entanto, apesar do baixo número de amostras positivas detectado, verificou-se que este total incluía 2 que não foram detectadas pelos Métodos I e II, ou seja, 11,8% do total de amostras com *L. monocytogenes*. Estes resultados indicam que das 21 amostras inicialmente suspeitas no teste de hibridação do DNA, em 16 não foi possível confirmar o resultado. A disparidade verificada pode ser explicada, atendendo a que para a confirmação se recorre à suspensão inicial em PBS, a qual foi obtida a partir da totalidade da cultura presente no meio de Oxford Agar, de acordo com o preconizado pelo método.

Contrariamente ao que é referido quanto à sensibilidade do método III¹⁷, 5 dos resultados negativos obtidos por este método, revelaram-se positivos por um ou ambos dos métodos convencionais.

Relativamente à abordagem estatística propôs-se que, metodologicamente, fosse estudada a concordância entre os vários métodos, existindo dois contextos de concordância que podem ser utilizados.

No primeiro contexto necessitamos conhecer a verdade. Para tal, uma possibilidade é pensarmos que os três métodos entre si conseguem estabelecer a verdade. Perante a verdade estabelecida pelos três métodos, ou seja, se se encontrou por um dos métodos *Listeria monocytogenes*, então a amostra estava contaminada. Os casos positivos são certamente positivos, levam a concluir que a prevalência de *L. monocytogenes* observada nas amostras (0,2615) é a verdadeira prevalência ou, mais provavelmente, um seu limite inferior. Isto é, a verdadeira prevalência é pelo menos 0,2615 para o conjunto de queijos observados.

Podemos comparar os três métodos, um a um, com a verdade por estes estabelecida. Para isso, o único coeficiente que parece ser aqui pertinente é o da sensibilidade, ou seja, a probabilidade de o método x classificar positivo quando a amostra está de facto contaminada. Isto, visto que a especificidade será sempre 1, pois ser positivo no método x é ser positivo (no sentido de ser a verdade).

Sensibilidades

Método I	Método II	Método III
0,71	0,65	0,29

O Método I parece ser mais sensível, no entanto é difícil dizer que é melhor que o Método II. Por outro lado, é claro que o Método III é muito menos sensível que os restantes.

Podemos também comparar os métodos entre si, assumindo que não existe *uma verdade*, ou *golden standard*, ou seja estabelecendo um contexto interobservacional, o que se faz como se descreveu no ponto 2.4.

Método I vs. Método II:

Nível de classificação conjunta = 0,81 (Figura 2)

Supondo que os métodos são iguais, o nível de classificação individual de cada um destes métodos será 90%.

Método I (ou Método II) vs. Método III:

Nível de classificação conjunta = 0,65 (Figura 3 e 4).

Supondo que o Método I (ou II) classificam correctamente a um nível de 90% (como acabamos de ver acima), temos que o nível de classificação do Método III é 72%, claramente inferior aos restantes.

$$(0,65 = 0,90 \cdot x \Leftrightarrow x = \frac{0,65}{0,90} \Leftrightarrow x = 0,72)$$

Repare-se que a igualdade de níveis de classificação conjunta entre Método I-Método III e Método II-Método III, confirmam o que se acaba de dizer. Assim, por vias diferentes chegamos à mesma conclusão que o laboratório, de que o Método III é menos *eficiente* que os métodos convencionais.

Comparação das passagens dos Métodos I e II:

Existia a convicção, ao nível laboratorial, de que os Métodos I e Método II variariam na sua sensibilidade nas diferentes passagens. Por conseguinte, utilizou-se a mesma metodologia para averiguar se existiram diferenças nas diferentes passagens dos métodos convencionais.

Nível de classificação conjunta estimada.

Método I	Método II		
	1.ª Passagem	2.ª Passagem	3.ª Passagem
1.ª Passagem	0,85 (0,92)	0,77 (0,88)	0,87 (0,93)
2.ª Passagem	0,83 (0,91)	0,81 (0,90)	0,86 (0,93)
3.ª Passagem	0,81 (0,90)	0,78 (0,88)	0,76 (0,87)

Entre parêntesis apresenta-se o nível de classificação de cada Passagem/método supondo que as passagens método a método são iguais.

Embora empiricamente a 2.ª passagem do Método II e a 3.ª do Método I pareçam menos eficazes,

não existe qualquer evidência estatística de falta de homogeneidade entre passagens, logo a conclusão a tirar é que as passagens dos Métodos I e II não parecem diferir entre si.

4. Conclusão

O objectivo deste estudo foi efectuar a pesquisa de *Listeria sp.*, com especial destaque para a espécie *Listeria monocytogenes*, em queijos de pasta mole e avaliar comparativamente 3 métodos analíticos: 2 métodos convencionais (I e II) e 1 método rápido (III).

A partir de um total de 65 amostras estudadas, em que 17 se revelaram positivas, isolou-se *L. monocytogenes* em 8 amostras (47%) e *L. monocytogenes* associada a outras espécies de *Listeria*, em 9 amostras (53%) (Tabela VII). Estes resultados podem considerar-se preocupantes na medida em que o isolamento de uma espécie do género *Listeria*, implica por si só um risco sanitário²⁸. Há ainda que ter em conta que se trata de um microrganismo ubiqüitário, não existindo processamento tecnológico capaz de garantir a ausência de *L. monocytogenes* nos alimentos, pelo que se deve evitar a contaminação e limitar o mais possível a multiplicação.

Em relação aos diferentes métodos utilizados e observando a Tabela VIII, verifica-se que o Método III (Ensaio da Gene-Trak) permite obter uma resposta 4 a 5 dias mais cedo, para o caso das amostras negativas, do que os métodos convencionais (I e II). Contudo, para as amostras positivas, apenas se obtém uma antecipação de resposta de 2 dias, comparativamente aos Métodos I e II. Isto pode ser explicado porque, segundo o que é referido pelo fabricante, um resultado positivo obtido pelo Método III indica a presença de *Listeria sp.*, sendo porém necessário efectuar a identificação bioquímica da espécie de *Listeria* presente, o que implica um aumento no número de dias, para se obter uma resposta conclusiva. Já no caso de se obter um resultado negativo, para a presença de *Listeria sp.*, não é necessário confirmá-lo, obtendo-se uma resposta em 72 h no máximo. Conclui-se assim que, apesar da maior rapidez na obtenção de resultados, o Método III não nos parece constituir uma alternativa fiável aos Métodos I e II, quer pela dificuldade de confirmar os resultados presuntivamente positivos, quer pela obtenção de resultados falsos negativos, como já foi referido anteriormente.

Este estudo, embora feito com um número reduzido de amostras, revelou uma percentagem de positividade de *L. monocytogenes* que é comparável à encontrada em trabalhos realizados noutros

países para o mesmo tipo de produto^{5,6}. O facto de se terem utilizado métodos que recorrem a meios de cultura mais inibidores justifica os valores encontrados, corroborando a hipótese levantada no trabalho anterior⁴. Alerta-se, dado não ser ainda conhecida a dose mínima infecciosa desta bactéria, para a necessidade de tomar medidas preventivas com vista a evitar a sua presença e disseminação neste tipo de queijos.

Agradecimentos

Expressamos os nossos melhores agradecimentos:

- a Rosália Maria Rodrigues S. Furtado, Técnica de Análises C. e S. Pública de 2.ª classe, pela colaboração técnica na execução dos métodos convencionais e na identificação das estirpes encontradas, assim como na recolha de dados e elaboração de quadros.
- a Isilda Almeida Ferreira, Técnica de Análises C. e S. Pública de 2.ª classe, a colaboração, na execução técnica do Método III.
- a Lina do Céu Gouveia Torres, Técnica Principal de Análises Clínicas e Saúde Pública, pela colaboração técnica na identificação de algumas das estirpes encontradas.
- ao Sector de Meios de Cultura pela preparação de todos os meios de cultura necessários à realização do trabalho.
- a Ezequiel Domingos, do Sector de Meios Audiovisuais, pela colaboração na execução gráfica.

Bibliografia

1. FERRON, P.; MICHARD, J. – Distribution of *Listeria spp* in confectioners' pastries from Western France: comparison of enrichment methods. *Int. J. Food Microbiol.* 18 (1993), p. 289-303.
2. MOURA, S.M.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D.G.M. – Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* 19 (1993), p. 229-237.
3. FARBER, J.M. – *Listeria monocytogenes*. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74: 4 (1991) p. 701-704.
4. SANTOS, M.I.S.; NOVAIS, M.R.L. – Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em alimentos. Montagem da técnica. *Rev. Port. de Nutr.* Vol. III: 4 (1991), p. 39-47.
5. DONNELLY, C.W. – Historical Perspectives on Methodology to Detect *Listeria monocytogenes*. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71: 3 (1988), p. 644-646.
6. PINI, P.N.; GILBERT, R.J. – The occurrence in the U.K. of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 6 (1988), p. 317-326.
7. GOLDEN, D.A.; BEUCHAT, L.R.; BRACKETT, R.E. – Direct plating technique for enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71: 3 (1988) p. 647-650.

8. YUNG, W. – Enrichment of *Listeria* – Selective agents against D-Streptococci. In Microbiological Week at IDF Headquarters, 3/3/87, Brussels. Supplement to IDF Circular 87/3.

9. LAMMERDING, A.M.; DOYLE, M.P. – Evaluation of enrichment procedures for recovering *Listeria monocytogenes* from dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 9 (1989) p. 249-268.

10. HAYES, P.S.; et al. Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 2 (1986) p. 438-440.

11. WATKINS, J.; SLEATH, K.P. – Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage sludge and river water. *J. Appl. Bacteriol.* 50 (1981) p. 1-9.

12. LOVETT, J. – Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes*. *Food Technol.* April (1988) p. 172-175.

13. SLADE, P.J.; COLLINS-THOMPSON, D.L. – Two-stage enrichment procedures for isolating *Listeria monocytogenes* from raw milk. *J. Food Protection.* 50: 11 (1987) p. 904-908.

14. CATTEAU, M. – Methodes de recherche et de denombrement traditionnelles. In *Listeria le point*, Lille, 1992.

15. SIRAGUSA, G.R.; JOHNSON, M.G. – Persistence of *Listeria monocytogenes* in yogurt as determined by direct plating and enrichment methods. *Int. J. Food Microbiol.* 7 (1988) p. 147-160.

16. BCR – VELD, P.H.; NOTHERMANS, S.H.W. – Detection of *Listeria monocytogenes* in foods spiked with reference materials containing *Listeria monocytogenes*. Report 281008001, May 1992.

17. Gene-Trake *Listeria* Assay DNA Hybridization Test for Detection of *Listeria* (modified version) – Gene-Trak Systems – Framingham.

18. CURTIS, G.D.W., et al. – A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 8 (1989) p. 95-98.

19. SEELIGER, H.P.R.; JONES, D. – 1986. Genus *Listeria*. Pirie, 383. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. VOL. 2. Eds. Sneath, P.H.A., Mair, N.S.; Sharpe, M.E. & Holt, J.G. Williams & Wilkins, Baltimore, 1940, p. 1235-1245.

20. LOVETT, J.; FRANCIS, D.W.; HUNT, J.M. – *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence, and pathogenicity. *J. Food Protection* 50: 3 (1987) p. 188-192.

21. BCR – VELD, P.H. et al. – Detection of *Listeria monocytogenes* in the presence of competitive microorganisms with the use of reference materials, BCR-FOOD Trial 4. Report 149108002, February 1992.

22. NOGUEIRA, P. – Um estudo sobre concordância para a avaliação da validade e fiabilidade de classificações nominais, Julho 1993. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e Escola Nacional de Saúde Pública (Relatório de Estágio).

23. LEWIS, S.J.; CORRY, J.E.L. – Comparison of a cold enrichment and the FDA method for isolating *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. from ready-to-eat food on retail sale in the U.K. *Int. J. Food Microbiol.* 12 (1991) p. 281-286.

24. FERNANDEZ, G.S.; et al. – Termorresistencia de *Listeria monocytogenes*. *Alimentaria*. Marzo (1989) p. 51-53.

25. McCARTHY, S.A.; MOTES, M.L.; McPHEARSON, R.M. – Recovery of heat-stressed *Listeria monocytogenes* from experimentally and naturally contaminated shrimp. *J. Food Protection.* 53: 1 (1990) p. 22-25.

26. ROTA, C.; et al. – Aislamiento et identificación de microorganismos del G. *Listeria* en quesos frescos, quesos curados y quesos fundidos. *Alimentaria*. Octubre (1992) p. 59-61.

27. WARBUTON, D.W.; et al. – A Canadian comparative study of modified versions of the «FDA» and «USDA» methods for the detection of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protection.* 54: 9 (1991) p. 669-676.

28. UBACH, M.; MIGUEL, A.; PUIG, P. – Aislamiento de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp. en queso fresco pasteurizado y requesón. *Alimentaria*. Junio (1991) p. 45-46.

TABELA I
RESULTADOS DA COMPARAÇÃO DE MÉTODOS

Método I vs Método II		
	LM-	LM+
LM-	50	3
LM+	4	8

Método I vs Método III		
	LM-	LM+
LM-	51	2
LM+	9	3

Método II vs Método III		
	LM-	LM+
LM-	52	2
LM+	8	3

LM- Ausência de *Listeria monocytogenes*
LM+ Presença de *Listeria monocytogenes*

TABELA II
NÚMERO DE ESTIRPES ESTUDADAS NAS DIFERENTES VARIEDADES DE QUEIJO

Tipo de Queijo	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria</i> sp
Queijo Serra da Estrela	308	40	30
Queijo Castelo Branco	3	57	2
Queijo Serra do Rabaçal	—	15	74
Queijo de Azeitão	—	37	—
Queijo fresco	—	28	—
Queijo «Camembert»	61	3	—
Queijo «Pur chevre»	10	—	—
Total	382	180	106

TABELA III
PRESENÇA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Comparação de métodos

	Método I	Método II	Método III
Amostras:			
<i>c/L. monocytogenes</i>	12	11	5
<i>c/L. sp</i>	9	10	7

TABELA IV
EFICÁCIA DOS MÉTODOS DE PESQUISA NO ISOLAMENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Métodos de pesquisa	N.º de amostras positivas
Método I	4
Método II	3
Método III	2
Método I + Método II	5
Método I + Método III	0
Método II + Método III	0
Método I + Método II + Método III	3
Total	17

TABELA V
INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ENRIQUECIMENTO NA RECUPERAÇÃO DE *L. MONOCYTOGENES*

Comparação dos Métodos I e II

Tipos de queijos	Método I			Método II		
	24h	48h	1 semana	24h	48h	1 semana
Serra da Estrela						
Certificados	4	—	1	3	—	—
Não certificados	4	—	1	4	—	—
Castelo Branco	—	—	—	1	1	—
«Camembert»	1	—	—	1	—	—
«Pur chevre»	1	—	—	—	—	—

TABELA VI
INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ENRIQUECIMENTO NA RECUPERAÇÃO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* NA TOTALIDADE DAS AMOSTRAS POSITIVAS OBTIDAS ATRAVÉS DOS MÉTODOS I E II

Tipos de Queijos	24h	48h	1 semana
Queijo Serra da Estrela	9	—	2
Queijo Castelo Branco	1	1	—
Queijo «Camembert»	1	—	—
Queijo «Pur chevre»	1	—	—
Total	12	1	2

TABELA VII
N.º DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA PRESENÇA DE *L. MONOCYTOGENES*

Tipos de Queijo	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i> + <i>Listeria sp</i>
Queijo Serra da Estrela	6	6
Queijo Castelo Branco	—	2
Queijo «Camembert»	—	1
Queijo «Pur chevre»	2	—

TABELA VIII
MÉTODOS USADOS PARA A PESQUISA DE *LISTERIA*

	Método I	Método II	Método III
Meio de pré-enriquecimento e incubação	LEB 30°C/16-20 h	LEB + SR141 30° C/24 h	LEB + SR141 30° C/16-20h
Meio de enriquecimento selectivo e incubação	LEB + SR141 37° C/24, 48h, 1s	LEB + SR141 37° C/24, 48h, 1s	—
Meio de isolamento selectivo e incubação	Oxford Agar 37° C/24-48h ↓ Identificação	Oxford Agar 37° C/24-48h ↓ Identificação	Oxford Agar 37° C/24-48h ↓ Ensaio Gene-Trak 3h

FIGURA 1
DISTRIBUIÇÃO DE AMOSTRAS POSITIVAS POR VARIEDADES

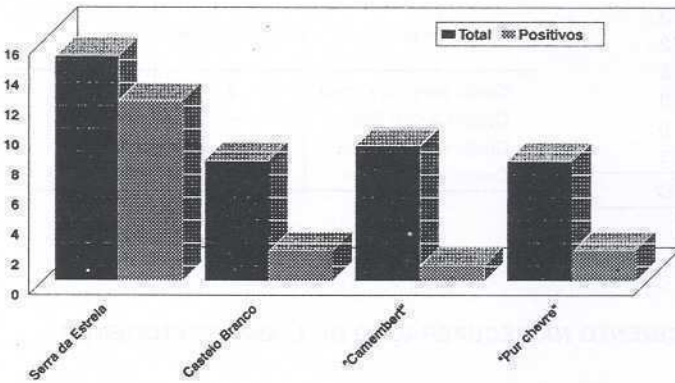


FIGURA 2
CONCORDÂNCIA MÉTODO I VS. MÉTODO II

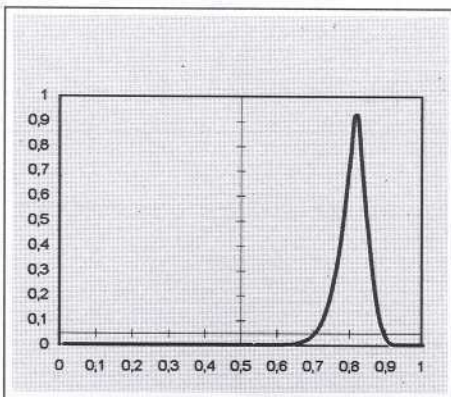


FIGURA 3
CONCORDÂNCIA MÉTODO I VS. MÉTODO III

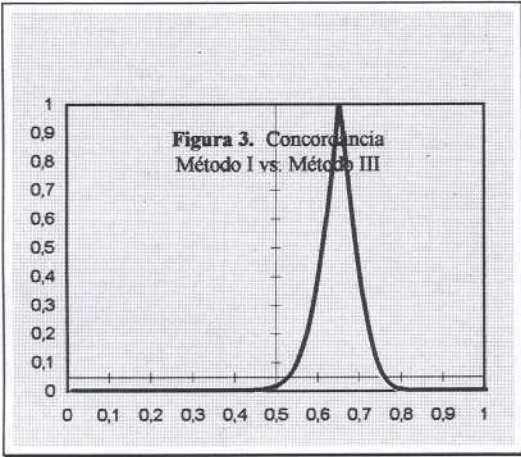
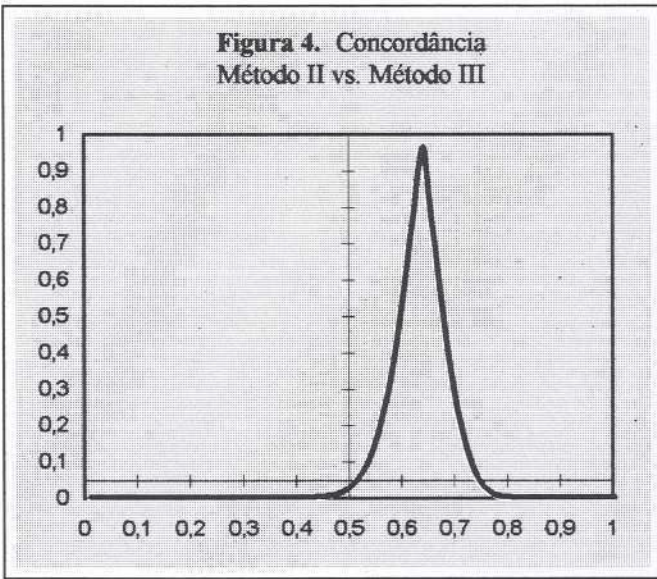


FIGURA 4
CONCORDÂNCIA MÉTODO II VS. MÉTODO III



Ocorrência de *Listeria spp.* e *Listeria monocytogenes* em pescado fumado a frio em Portugal

Gabriela Duarte*
 Manuela Vaz Velho*
 Paul Gibbs*

RESUMO

Este trabalho visou fazer o levantamento da ocorrência de *Listeria spp.* e *Listeria monocytogenes* em peixe fumado a frio produzido em Portugal. Durante um período de seis meses, em três fábricas de fumagem de pescado existentes em Portugal, foram colhidas amostras de peixe e ambientais, respectivamente ao longo da cadeia de processamento e antes do início da produção. Embora esporadicamente outras espécies possam ser utilizadas, os três tipos de pescado preferencialmente escolhidos pelas empresas e cuja produção foi analisada são: salmão fresco (*Salmo salar*) importado da Noruega, truta salmonada fresca (*Oncorhynchus mykiss*) produzida em Portugal por duas truiticulturas e espadarte congelado ou fresco (*Xiphias gladius*) com origens diversas. O produto final fumado, fatiado e embalado sob vácuo, é vendido refrigerado.

Foram recolhidas e analisadas 172 amostras. As frequências totais (n=172) de *Listeria* e de *L. monocytogenes* foram respectivamente 26,2% e 18,0%. À excepção de uma amostra de salmão e outra de truta frescos que continham *L. welshimeri*, em todas as outras amostras só se detectou *L. innocua* e *L. monocytogenes*. 3,5% do peixe fresco estava contaminado com *Listeria*, não se tendo detectado *L. monocytogenes*. Nos produtos finais a frequência de *Listeria* e de *L. monocytogenes* foi respectivamente de 3,5% e 1,2%. A frequência de contaminação com *Listeria* e *L. monocytogenes* encontrada nas fábricas A (n=81), B (n=54) e C (n=37) foi respectivamente de 43,2%, 27,2%; 13,0% e 9,3%; 8,1% e 8,1%.

Palavras-chave: Peixe fumado; *Listeria spp.*; *Listeria monocytogenes*; fábricas de fumagem.

ABSTRACT

Three cold-smoked fish processing plants were surveyed to determine the occurrence of *Listeria spp.* contamination. During six months environmental samples were collected at sites before the production head and fish samples along the process line. Fresh salmon (*Salmo salar*) from Norway, fresh salmon trout (*Oncorhynchus mykiss*) from two portuguese fish farms, and fresh or frozen swordfish (*Xiphias gladius*) of various origins were the raw materials utilized by the examined factories. The final product of all plants was presented sliced and vacuum packed and sold as a refrigerated product.

From a total of 172 samples the overall frequency of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* isolation was 26,2% and 18,0% respectively. *Listeria welshimeri* was found in two samples of fresh salmon and salmon trout, one in each. All the other positive samples contained only *L. innocua* and *L. monocytogenes*. 3,5% of the fish raw material to the smoking plants were contaminated with *Listeria* but not *L. monocytogenes* while 3,5% and 1,2% of the final product were positive for *Listeria spp.* and *L. monocytogenes*, respectively. In the plants A (n=81); B (n=54); and C (n=37) the frequency of isolation of *Listeria* and *L. monocytogenes* was 43,2% and 27,2%; 13,0% and 9,3%; 8,1% and 8,1%, respectively.

Keywords: Cold-smoked fish; *Listeria spp.*; *L. monocytogenes*; smoking processing plants.

* Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa – Porto.

Introdução

Listeria spp. são bacilos Gram +, aeróbios e/ou anaeróbios facultativos, não esporulados, com óptimo de temperatura entre 30 e 37° C, podendo crescer entre 1-45° C e a pH entre 6 e 8 não sobrevivendo a 60° C durante 30 minutos¹. A espécie *Listeria monocytogenes* foi responsável por alguns surtos de listeriose associado ao consumo de alimentos atingindo taxas de morbilidade de 25 a 30% na população alvo². A bactéria é patogénica sobretudo para os fetos de mulheres grávidas, recém-nascidos e pessoas com deficiência do sistema imunitário³. Até 1961, era a única espécie reconhecida no género. Desde então outras espécies foram incluídas: *L. grayi*, *L. murrayi*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. ivanoviï*. Até ao momento, embora tenha sido frequentemente isolada em peixe fumado, não há evidência de surtos de listeriose associados a este consumo. Enquanto alguns países (Alemanha, Reino Unido, Dinamarca, Austrália e Canadá) só consideram *L. monocytogenes* potencialmente patogénica para um grupo de alto risco, os Estados Unidos estabeleceram o «zero de tolerância», tendo já rejeitado importações de peixe fumado a frio onde foi detectada a presença deste microrganismo⁵.

A fumagem, é um dos métodos mais antigos de preservação de alimentos. O princípio de conservação da fumagem estava relacionado com a duração de exposição ao fumo e da temperatura do mesmo, bem como à salmoura forte onde previamente se imergia o produto. Actualmente, no caso do pescado, o processo de fumagem é bastante mais ligeiro e visa sobretudo conferir ao produto o sabor característico a fumo, ficando a conservação e a extensão do período de armazenagem do produto a cargo dos sistemas de refrigeração e/ou congelação. Existem dois métodos de fumagem: a quente e a frio. Este último é o mais utilizado em pescado de alto valor comercial e neste processo não ocorre coagulação das proteínas ao contrário da fumagem a quente que usa temperaturas superiores a 60° C. Como os fumados a frio são produtos pronto-a-comer e o calor usado no processo não é suficiente para inactivar *Listeria spp.* a contaminação destes produtos terá que ser evitada.

Material e métodos

a) Caracterização das fábricas de peixe fumado:

Fábrica A: Produz truta salmonada, salmão e espadarte fumados a frio; nesta empresa a salga do salmão e truta é feita a seco e a do espadarte em

salmoura. A temperatura do fumo ronda os 20° C e é feita em fumeiro tradicional sendo o fumo produzido pela combustão de uma mistura de madeiras não resinosas. É a empresa de maiores dimensões. Não possui sistema de limpeza e desinfeção programados.

Fábrica B: Produz truta salmonada, salmão e espadarte fumados a frio; nesta empresa a salmoura é usada para todas as espécies. A temperatura do fumo ultrapassa os 20° e no caso do espadarte pode atingir os 40° C. Utiliza um fumeiro mecânico com controlo de temperatura e humidade, sendo o fumo produzido por uma mistura de serradura de madeiras não resinosas. Possui sistema de limpeza e desinfeção programados.

Fábrica C: Produz salmão e espadarte fumados a frio e usa salga a seco para o salmão e salmoura para o espadarte. Esta empresa usa a mais baixa temperatura de fumo (10° C). Utiliza um fumeiro mecânico com controlo de temperatura e humidade sendo o fumo exclusivamente produzido por serradura de faia importada. A mão-de-obra é bastante reduzida. Não possui sistema de limpeza e desinfeção programados.

O salmão utilizado por todas as fábricas é importado da Noruega pela mesma empresa e é transportado em camiões frigoríficos em caixas de poliestireno expandido, em camada única de peixe coberta de gelo. O camião possui sistema rigoroso de controlo de temperatura e como não há interrupção da cadeia de frio, chega a Portugal em óptimas condições. São utilizados dois tamanhos 4-5 e 6-7 quilogramas. O peixe é depois recolhido em furgões isotérmicos que o transportam às respectivas empresas de fumagem.

A truta salmonada é produzida por duas truiticulturas do norte de Portugal. O peixe é colocado em caixas de esferovite (duas camadas de peixe cobertas de gelo) e transportado em furgões isotérmicos até Lisboa onde é recolhido por veículos semelhantes pertencentes às empresas de transformação. O espadarte, congelado ou fresco, tem origens diversas consoante a época do ano e é capturado em Portugal por diferentes embarcações de pesca.

O produto final fumado, quer seja salmão, truta salmonada ou espadarte, é colocado à venda geralmente fatiado e embalado a vácuo em embalagens de 100 g ou, em alguns casos, é apresentado em filete inteiro também embalado a vácuo. Em ambas as apresentações é vendido refrigerado.

b) Recolha de amostras

Durante um período de seis meses, ao longo da cadeia de processamento, desde a captura até ao

produto final, recolheram-se e analisaram-se 77 amostras ambientais e 95 amostras de peixe.

Para o peixe fresco, amostras de equipamento e superfícies de trabalho usou-se a técnica de zaragatoa, numa área de cerca de 10 cm², em número de 5 zaragatoas por amostra colocadas em frasco estéril contendo 25 cm³ de água peptonada 0,1%.

As amostras de água canalizada foram recolhidas em frascos estéreis de 500 cm³ para posterior filtração.

As porções de peixe, cerca de 25 g, nas várias fases de transformação, foram obtidas por corte com facas e pinças esterilizadas e recolhidas em sacos esterilizados fechados com fita adesiva.

Todas as amostras foram transportadas em malas isotérmicas arrefecidas por placas eutéticas e colocadas em câmara frigorífica a 2-4° C e analisadas dentro de um período que nunca excedeu os sete dias (dada a distância do local de amostragem ao local de análise e para possibilitar a recolha de amostras nas várias fases do processo que pode durar uma semana, na truta e salmão, até duas semanas no caso do espadarte, não se pôde iniciar a análise mais cedo).

c) Isolamento, confirmação e identificação de *Listeria spp.*:

Os 25 cm³ de água peptonada das amostras de peixe fresco, equipamento e superfícies foram colocados em 225 cm³ de caldo de enriquecimento primário UVM I modificado (Universidade de Vermont, Merck) e incubadas (24 ± 2 horas a 30° C). Os 500 cm³ das amostras de água foram filtrados sob vácuo com filtros de membrana de porosidade 0,45 µm (Gelman Sciences, 47 mm) sendo os filtros colocados em 20 cm³ de UVM I e incubados (24 ± 2 horas a 30° C). Os 25 g de amostras de peixe processado depois de colocados em 225 cm³ de UVM I e homogeneizados no Stomacher (Seward 400) foram incubadas (24 ± 2 horas a 30° C).

0,1 cm³ do enriquecimento primário foram transferidos para 10 cm³ de UVM II modificado (UVM I+ 0.013 g/l de acriflavina) e para 10 cm³ de caldo de enriquecimento Fraser (Merck). O UVM II inoculado foi incubado (24 ± 2 horas a 30° C). O enriquecimento Fraser inoculado foi incubado 24 a 48 horas a 30° C.

Paralelamente, usou-se o bactómetro (Bactometer 120SC, BioMerieux), método eléctrico para monitorizar a capacidade das amostras, transferindo-se 0,05 cm³ de cada enriquecimento primário para 2 cm³ de meio líquido LED (*Listeria Electrical Detection medium*)⁶ pré-aquecido a 30° C nos

módulos do bactómetro. O bactómetro foi programado para um tempo e uma temperatura experimentais de 48 ± 2 horas a 30° C, respectivamente.

Todas as amostras que apresentaram crescimento (turbidez no UVM II; escurecimento no Fraser; uma variação de 30% de crescimento em 30 horas nas curvas obtidas no bactómetro) foram repicadas em Oxford agar (Merck) e PALCAM agar (Merck) e incubadas (48 ± 2 horas a 30° C). Todas as colónias suspeitas foram repicadas em meio TSA (Tryptone Soya Broth, Lab M), adicionado de 1,2% de agar (Lab M) e de 0,6% de extracto de levedura (Lab M) e incubadas (24 ± 2 horas a 37° C) sendo depois confirmadas por meio da coloração de Gram, catalase, oxidase, mobilidade em cambalhota (exame microscópico a fresco de uma de colónia repicada após incubação das placas de TSA, 24 ± 2 horas a 25° C), e diferenciadas ao nível da espécie por meio do teste de CAMP com *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Rhodococcus equi* NCTC 1691 em placas de gelose de sangue (BioMerieux) e APIs (10300, BioMerieux).

Resultados

Foram recolhidas e analisadas 77 amostras ambientais e 95 amostras de pescado. As frequências totais (n=172) de *Listeria spp.* e de *L. monocytogenes* foram respectivamente 26,2% e 18,0%. À excepção de uma amostra de salmão e outra de truta frescos que continham *L. welshimeri* em todas as outras amostras só se detectaram *L. innocua* e *L. monocytogenes*. 3,5% do peixe fresco estava contaminado com outras espécies de *Listeria* que não *L. monocytogenes*. Nos produtos finais embalados a vácuo a frequência de *Listeria spp.* e de *L. monocytogenes* foi respectivamente de 3,5% e 1,2%.

A frequência de contaminação com *Listeria spp.* e *L. monocytogenes* encontrada nas fábricas A (n=81), B (n=54) e C (n=37), foi respectivamente de 43,2% e 27,2%; 13,0% e 9,3%; 8,1% e 8,1%.

Incidência de Listeria spp. nas amostras ambientais (Quadro I)

Foram analisadas 77 amostras ambientais. A frequência total (n=77) de contaminação com *Listeria spp.* no conjunto das três fábricas foi 9,1% (7/77). Cinco das sete amostras contaminadas continham só *L. monocytogenes* enquanto que duas continham simultaneamente *L. monocytogenes* e *L. innocua*. As frequências de contaminação nas fábricas A (n=26), B (n=29) e C (n=22) foram respectivamente 11,5%, 6,9% e 9,1%. *L. monocytogenes* foi encontrada nas

QUADRO I
OCORRÊNCIA DE *LISTERIA SPP.* NO EQUIPAMENTO E SUPERFÍCIES ANTES DO INÍCIO DA PRODUÇÃO

Origem	(N.º positivos/n.º total de amostras)					
	Fábrica A		Fábrica B		Fábrica C	
	L. monocytogenes	L. innocua	L. monocytogenes	L. innocua	L. monocytogenes	L. innocua
Mesas de trabalho	*	*	0/2	0/2	*	*
Tapete de borracha	*	*	*	*	0/1	0/1
Tábuas	2/4	1/4	1/2	0/2	0/2	0/2
Facas	0/4	0/4	1/3	1/3	0/4	0/4
Tanques de lavagem/salmoura	1/1	0/1	0/2	0/2	*	*
Fatiadora de salmão	*	*	0/2	0/2	1/3	0/3
Tabuleiros de fumeiro	0/2	0/2	0/1	0/1	0/3	0/3
Saca de embalar	0/3	0/3	0/5	0/5	0/2	0/2
Cartão laminado	0/1	0/1	0/3	0/3	0/2	0/2
Lâmina de plástico	0/1	0/1	*	*	*	*
Grades de drenagem	*	*	0/2	0/2	*	*
Água de lavagem	0/3	0/3	0/3	0/3	0/2	0/2
Salmoura de espadarte	0/3	0/3	n/d	n/d	*	*
Ganchos de fumeiro	0/4	0/4	0/2	0/2	*	*
Fatiadora de espadarte	*	*	0/1	0/1	1/3	0/3
Paletes de aço/espardarte	*	*	0/1	0/1	*	*
TOTAL	3/26	1/26	2/29	1/29	2/22	0/22

* Não existe este passo na fábrica.

n/d - Não determinado.

tábuas (2/4) e tanques de lavagem (1/1) da fábrica A; tábuas (1/2) e facas (1/3) da fábrica B e fatiadora de salmão (1/1) e espardarte (1/1) da fábrica C. *L. innocua* estava presente em 3,8% e 3,4% das amostras das fábricas A e B, respectivamente. As duas amostras positivas da fábrica C estavam exclusivamente contaminadas com *L. monocytogenes*.

Incidência de Listeria spp. nas amostras de pescado (Quadros II, III e IV)

Foram analisadas 95 amostras de pescado. As frequências totais (n=95) de *Listeria spp.* e *L. monocytogenes* foram respectivamente 40% e 24,2%. As frequências de *Listeria spp.* e *L. monocytogenes* nas

QUADRO II
OCORRÊNCIA DE *LISTERIA SPP.* EM SALMÃO (*SALMO SALAR*) AO LONGO DA CADEIA DE PROCESSAMENTO

Origem	(N.º positivos/n.º total de amostras)					
	Fábrica A		Fábrica B		Fábrica C	
	L. monocytogenes	L. innocua	L. monocytogenes	L. innocua	L. monocytogenes	L. innocua
Peixe fresco*	0/4	3/4	n/d	n/d	0/1	0/1
Após filetagem	3/4	3/4	1/1	1/1	1/2	1/2
Após lavagem	2/4	3/4	n/d	n/d	n/d	n/d
Após salmoura	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2
Após fumagem	2/5	2/5	0/3	0/3	0/1	0/1
Depois de fatiado	1/3	1/3	0/2	0/2	n/d	n/d
Produto final	1/5	0/5	0/3	2/3	0/4	0/4
TOTAL	9/26	12/26	1/10	3/10	1/10	1/10

n/d - Não determinado

* Numa das amostras da fábrica A foi detectada *L. welshimeri*.

fábricas A (n=55), B (n=25) e C (n=15) foram respectivamente 58,2% e 34,5%, 20,0% e 12,0% e 6,7%.

Incidência de *Listeria spp.* em salmão (Quadro II)

Foram analisadas 46 amostras de salmão. As frequências totais (n=46) de *Listeria spp.* e *L. monocytogenes* foram respectivamente 39,1% e 23,9%. As frequências de *Listeria spp.* e *L. monocytogenes* nas fábricas A (n=26), B (n=10) e C (n=19) foram 53,8% e 34,6%; 30% e 10%; e 10%, respectivamente.

L. monocytogenes foi encontrada em amostras de produto após filetagem nas fábricas A (3/4), B (1/1) e C (1/2), e em amostras de produto após lavagem (2/4), após fumagem (2/5) e após corte em fatias (1/3) na fábrica A.

No produto final, só a amostra positiva proveniente da fábrica A foi confirmada como tendo *L. monocytogenes*. As amostras positivas de produto

final da fábrica B (2/3) estavam exclusivamente contaminadas com *L. innocua*.

Na fábrica A, numa amostra de salmão fresco (1/4) foi encontrada *L. welshimeri* tendo-se detectado *L. innocua* nas três restantes (3/4).

Incidência de *Listeria spp.* em espadarte (Quadro III)

Foram analisadas 23 amostras de espadarte. As frequências totais (n=23) de *Listeria spp.* e *L. monocytogenes* foram respectivamente 39,1% e 21,7%. As frequências de *Listeria spp.* e *L. monocytogenes* nas fábricas A (n=11) e B (n=7) foram 72,7% e 36,4%; e 14,3%. Nesta fábrica B, a única amostra positiva encontrada, que correspondia a espadarte após corte e lavagem, só continha *L. monocytogenes*. Não foi encontrada *Listeria spp.* no espadarte da fábrica C (n=5). Na fábrica A foi encontrada *L. monocytogenes* nos produtos após salmouragem (2/3), após fumagem (1/1) e no produto final (1/5). Nesta última fábrica foi detectada *L. innocua* na matéria-prima congelada (2/2), após salmouragem (3/3) e no produto final (1/1).

QUADRO III

OCORRÊNCIA DE *LISTERIA SPP.* EM ESPADARTE (*XIPHIAS GLADIUS*) AO LONGO DA CADEIA DE PROCESSAMENTO

(N.º positivos/n.º total de amostras)

Origem	Fábrica A		Fábrica B		Fábrica C	
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>
Peixe fresco/congelado	0/2	2/2	n/d	n/d	0/1	0/1
Após corte e lavagem	n/d	n/d	1/1	0/1	n/d	n/d
Após salmoura	2/3	3/3	n/d	n/d	n/d	n/d
Após fumagem	1/1	0/1	n/d	n/d	n/d	n/d
Produto embalado a vácuo	n/d	n/d	0/2	0/2	n/d	n/d
Depois de fatiado	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
Produto final	1/5	1/5	0/4	0/4	0/4	0/4
TOTAL	4/11	6/11	1/7	0/7	0/5	0/5

n/d - Não determinado

Incidência de *Listeria spp.* em truta salmonada (Quadro IV)

Foram analisadas 26 amostras de truta salmonada. A fábrica C não processa esta espécie. As frequências totais (n=26) de *Listeria* e *L. monocytogenes* foram respectivamente 42,3% e 26,9%. As frequências de *Listeria* e *L. monocytogenes* nas fábricas A (n=18) e B (n=8) foram 55,6% e 33,3%, e 12,5%, respectivamente. Na única amostra positiva encontrada na

fábrica B, produto após salmouragem, foram detectadas *Oⁿ monocytogenes* e *L. innocua*.

Na única amostra positiva do peixe fresco da fábrica A só foi encontrada *L. welshimeri*. Nesta fábrica, foi detectada *L. monocytogenes* nas amostras do produto após filetagem (2/3), após fumagem (1/2), depois de fatiado (2/2) e no produto final (1/4). *L. innocua* foi detectada em todas as fases do processo da fábrica A, excepto no peixe fresco.

QUADRO IV
OCORRÊNCIA DE *LISTERIA SPP.* EM TRUTA SALMONADA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) AO LONGO DA CADEIA DE PROCESSAMENTO

Origem	(N.º positivos/n.º total de amostras)			
	Fábrica A		Fábrica B	
	L. monocytogenes	L. innocua	L. monocytogenes	L. innocua
Peixe fresco*	0/3	0/3	n/d	n/d
Após filetagem	2/3	1/3	0/1	0/1
Após lavagem	0/2	1/2	*	*
Após	0/1	1/1	1/1	1/1
Salga/salmouragem	1/2	2/2	n/d	n/d
Após fumagem	*	*	0/2	0/2
Filete embalado a vácuo	2/2	2/2	n/d	n/d
Produto final	1/5	1/5	0/4	0/4
TOTAL	6/18	8/18	1/8	1/8

* Na fábrica A foi encontrada *L. welshimeri* (1/3).

** Não existe este passo na fábrica.

n/d - Não detectado.

Discussão

Antes deste estudo não havia qualquer informação publicada acerca da ocorrência de *Listeria spp.* em pescado fumado a frio em Portugal. Todavia, os resultados obtidos estão de acordo com estudos anteriores realizados noutros países^{2,5,7,8,9,10,11,12}, sendo a presença de *Listeria spp.* em pescado fumado a frio e um facto também verificado em Portugal.

A contaminação das fábricas de fumagem com *Listeria spp.* era esperada uma vez que estes organismos são ubiqüitários e o processo de fumagem a frio e a concentração da salmoura, não inviabilizam o seu aparecimento em qualquer dos passos da cadeia de fabrico. Em estudos anteriores², mas de fumagem de truta a quente (temperaturas de fumo de 65° C durante 30 minutos) nunca se detectou *Listeria spp.* nos produtos após fumagem.

A alta contaminação da Fábrica A, quando comparada com as outras duas fábricas, era de esperar, dada a elevada produção desta fábrica com maior número de mão-de-obra envolvida e a ausência de programas de limpeza e desinfecção. Para além disso, nesta fábrica as espécies salmão e truta são processadas no mesmo dia e quase simultaneamente sem haver separação do processo. Isto equivale a dizer que se uma das espécies estiver contaminada a outra também pode vir a estar dado que o equipamento e superfícies não foram limpos e desinfectados entre cada processo. Surpreendentemente, não se detectou *Listeria spp.* nos produtos finais da Fábrica C, embora tenha sido detectada nas

fatiadoras de salmão e espadarte e no salmão após filetagem. Aliás esta fábrica apresentou a mais baixa incidência de *Listeria spp.*

Os resultados de um estudo¹² que pretendia avaliar a eficácia de salmouras de concentrações típicas nos produtos fumados a frio (concentração de NaCl de 6% a 20% p/v) revelaram a ineficácia dessas concentrações na redução do número de *L. monocytogenes* nos produtos após salmouragem.

De igual modo, neste estudo não se verificou qualquer efeito da salmoura na redução do número destes microrganismos e, no caso do espadarte da fábrica A, foi precisamente neste passo, após salmouragem, que se encontrou a maior contaminação do produto o que leva a crer que o período de salmoura proporcionou condições de crescimento da *Listeria spp.* que o produto fresco já continha antes da sua imersão na salmoura. Nunca foi encontrada *Listeria spp.* na salmoura limpa antes de ser utilizada.

As diferenças entre os métodos de amostragem de peixe fresco inteiro (zaragatoa) e de peixe ao longo do processo (homogeneização de 25 g) poderá ser responsável pelo facto de nunca se ter sido detectada *Listeria monocytogenes* em peixe fresco, uma vez que o primeiro método pode ser menos sensível¹¹.

As temperaturas inferiores a 30° C usadas durante o período de fumagem podem retardar o crescimento de *Listeria spp.*¹³, mas certamente não eliminam estes microrganismos pois, neste estudo, eles foram detectados nos produtos após fumagem e, no caso do salmão e da truta, não houve redução

aparente do seu número em relação ao passo anterior. Do mesmo modo, a embalagem sob vácuo não parece ter qualquer influência na redução de *Listeria spp.* uma vez que no produto final, mesmo após um período de armazenamento de duas semanas a 2-4° C, foi detectada a sua presença.

Foi verificado através de um estudo⁷ que envolveu amostras de salmão fresco, de origens diversas usado por empresas de fumagem, que a contaminação com *Listeria* estava confinada à parte mais superficial do produto e a sua carne não estava contaminada após a captura ou após a descongelação. Tudo leva a crer que se a operação de lavagem do peixe fresco logo após a captura e à entrada da fábrica for realizada com água clorada corrente, a consequente redução da carga microbiana antes das operações de filetagem irá impedir a entrada do microrganismo no músculo do pescado.

O facto de ser frequente o aparecimento de *L. monocytogenes* em peixe fumado a frio, torna necessário identificar os locais onde a contaminação possa ocorrer e onde se possa estabelecer um controlo efectivo durante a produção. Como já foi mencionado, nem a salmoura nem a temperatura do fumo usados neste processo podem eliminar este microrganismo patogénico. Será necessário intervir a montante, assegurando que a matéria-prima não esteja contaminada, estabelecer um programa regular de limpeza e desinfecção das fábricas e evitar as contaminações cruzadas. A rota e ciclo de contaminação de *L. monocytogenes* em peixe fumado é difícil de conhecer. Muitas das amostras analisadas continham simultaneamente *L. innocua* e *L. monocytogenes*, o que nos leva a concluir que, embora em alguns dos produtos não tenha sido encontrada *L. monocytogenes* isto por si só não assegura que os mesmos produtos não possam vir a ser contaminados com este microrganismo, uma vez que as exigências fisiológicas das várias espécies de *Listeria* são em tudo semelhantes.

Este trabalho visava sobretudo fazer o levantamento de *Listeria spp.* em peixe fumado a frio em Portugal, mas após esta etapa de confirmação da

sua presença nestes produtos portugueses outros estudos se seguirão, como seja a determinação da ocorrência deste microrganismo ao nível da matéria-prima antes da sua chegada à fábrica e a caracterização intraespecífica dos isolados de *L. monocytogenes* encontrados.

Referências

- Seeliger, H.P. e Jones, D. – Genus *Listeria* Pirie 1940. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2. Secção 14. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986, p. 593-596.
- Jemmi, T. e Keusch, A. – Occurrence of *Listeria monocytogenes* in freshwater farms and fish-smoking plants. **Food Microbiology**. 11 (1994), p. 309-316.
- ICMSF. Choice of sampling plan and criteria for *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology** 22 (1994).
- Lovett, J. – Taxonomy and general characteristics of *Listeria spp.* In Miller, A.; Smith, J. e Smokuti, G. – Foodborne Listeriosis. Amsterdam: Elsevier Science Publisher 1990, p. 9-12.
- Ben Embarek, P.K. – Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. **International Journal of Food Microbiology** 23 (1994), p. 17-34.
- Rodrigues, M.J.; Capell, C. e Kirby, R. – A new capacitance medium for presumptive detection of *Listeria spp.* from cheese samples. **Journal of Microbiological Methods** 23 (1995), p. 291-296.
- Eklund, M.W. *et al.* – Incidence and Sources of *Listeria monocytogenes* in Cold-smoked Fishery Products and Processing Plants. **Journal of Food Protection** 58: 5 (1995), p. 502-508.
- Dillon, R.; Patel, T. e Ratnam, S. – Prevalence of *Listeria* in Smoked Fish. **Journal of Food Protection** 55: 11 (1992), p. 866-870.
- Fuchs, R.S. e Nicolaidis, L. – Incidence of *Listeria* in hot – and cold-smoked fish. **Letters in Applied Microbiology** 19 (1994), p. 394-396.
- Huss, H.; Ben Embarek, P. e Jeppesen, V. – Control of biological hazards in cold smoked salmon production. **Food Control** 6: 6 (1995), p. 335-340.
- Rørvik, L.; Caugant, D. e Yrødstad, M. – Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria spp.* in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. **International Journal of Food Microbiology** 25 (1995), p. 19-27.
- Hudson, J.A. – Efficacy of high sodium chloride concentrations for the destruction of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology** 14 (1992), p. 178-180.
- Guyer S. e Jemmi, T. – Behaviour of *Listeria monocytogenes* during fabrication and storage of experimentally contaminated smoked salmon. **Applied and Environmental Microbiology** 5: 57 (1991), p. 1523-1527.

Longevidade e senescência do eritrócito humano

Alice Santos Silva*
 Elisabeth M. B. Castro*
 Alexandre Quintanilha**

RESUMO

O tempo médio de vida do eritrócito é de cerca de 120 dias. Ao longo deste período a célula vai sofrendo modificações resultantes de um processo natural de envelhecimento. Sendo uma célula de capacidade biossintética limitada, é também, por consequência, uma célula com uma limitada capacidade de manutenção das suas propriedades e recuperação de alterações físicas e químicas. O tempo de vida do eritrócito pode ser abreviado, caso ocorram defeitos intrínsecos, que determinem lesão precoce do eritrócito. A marcação, para a remoção do eritrócito, é feita por exposição do neoantígeno de senescência, imunologicamente relacionado com a banda 3, ao qual se liga o auto-anticorpo anti-banda 3, que estimula a deposição de complemento. Em conjunto, IgG's e complemento, medeiam o reconhecimento e remoção de eritrócitos senescentes ou lesados, pelos macrófagos.

Palavras-chave: Eritrócito; senescência eritrocitária; auto-anticorpos anti-banda 3; remoção eritrocitária.

SUMMARY

During its life span (about 120 days) the erythrocyte is exposed to various insults and undergoes physical and chemical changes, which become more pronounced with cell age. Erythrocytes that develop intracellular defects earlier during their life span are removed from circulation at an earlier stage, since the erythrocyte has a reduced repair mechanism. The pathway for the removal of senescent or damaged erythrocytes involve the exposition of the senescent neoantigen, immunologically related to band 3, which binds to a specific IgG auto-antibody. These naturally occurring anti-band 3 antibodies and complement, together, mediate the recognition and removal of senescent or damaged erythrocytes, by macrophages.

Keywords: Erythrocyte; erythrocyte senescence; anti-band 3 auto-antibodies; erythrocyte removal.

1. Introdução

O tempo médio de vida do eritrócito, isto é, a sua potencial longevidade é de cerca de 120 dias. Ao longo deste período a célula vai sofrendo modificações resultantes de um processo natural de envelhecimento. Sendo uma célula de capacidade biossintética limitada, é também, por consequência, uma célula com uma limitada capacidade de manutenção das suas propriedades e recuperação de alterações físicas e químicas. De facto, o eritrócito

circulante sofre e acumula modificações físicas e químicas, que constituem marcadores de envelhecimento celular.

À medida que a célula se aproxima dos 100 dias de vida, observa-se uma redução na actividade enzimática das diversas enzimas operantes, que se reflecte na deterioração dos processos metabólicos delas dependentes. A redução de actividade da via de Embden-Meyerhof (EM) conduz a uma diminuição do ATP (adenosina trifosfato) disponível e, por consequência, a um desequilíbrio dos processos energético-dependentes, e à redução da capacidade de deformabilidade e estabilidade da membrana. A falência da via das hexososes monofosfato (HMF) torna a célula incapaz de superar favoravelmente uma situação não fisiológica de stress oxidativo.

* Departamento de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto

** Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto; Departamento de Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

As lesões bioquímicas decorrentes do processo de envelhecimento determinam alterações físicas e químicas na célula. Observam-se alterações no volume da célula, na sua densidade e nos componentes citoplasmáticos e da membrana. O volume celular reduz-se e parece resultar da perda de K^+ e de microvesiculação da membrana. Associa, ainda, um aumento de densidade, uma redução na capacidade de deformabilidade e também uma redução da mobilidade eléctrica, devida a uma redução das cargas negativas de superfície¹.

Na composição da membrana as alterações senescentes são subtis, atribuindo-se a redução observada nos lípidos, nas proteínas e enzimas de membrana, à perda de pequenas porções da membrana, com eventual perda de conteúdo citoplasmático. Estarão na origem desta fragmentação lesões mecânicas sofridas pelo eritrócito, particularmente a nível esplênico e da microcirculação. De facto, as modificações na membrana da célula senescente, referem-se mais à organização dos seus constituintes – fosfolípidos, resíduos de hidrato de carbono, proteínas e enzimas. A susceptibilidade dos fosfolípidos da membrana à fosfolipase A_2 aumenta nos eritrócitos mais velhos, o que poderá explicar a organização fosfolipídica alterada e a assimetria reduzida, observada nos eritrócitos senescentes². A peroxidação lipídica é também frequente nos eritrócitos mais velhos, sobretudo naqueles que sofreram *stress oxidativo*³. As modificações em proteínas da membrana incluem alterações por oxidação, glicosilação não enzimática, carboximetilação, fosforilação, agregação covalente devida à activação do sistema Ca^{++} transglutaminase e degradação^{4,7}. É ainda frequente a ligação de proteínas citoplasmáticas e do citoesqueleto à membrana¹.

Nenhuma das alterações decorrentes do processo fisiológico de envelhecimento atinge valores que, só por si, determinem incapacidade metabólica, condenando a célula à morte. A importância relativa de cada um deles no processo de remoção eritrocitária é controverso. Parece, no entanto, obrigatório que o mecanismo determinante de remoção, dependa de modificações sofridas e acumuladas pelo eritrócito, dada a sua incapacidade biossintética. Essas modificações mediarão alterações a nível da membrana, por forma a poderem ser reconhecidas como células senescentes pelos macrófagos. O tempo de vida do eritrócito pode ser abreviado, caso ocorram defeitos intrínsecos, como hemoglobinopatias, enzimopatias, defeitos na estrutura ou composição da membrana ou, ainda, quando se desenvolvem mecanismos ou factores extrínsecos que determinem lesão precoce do eritrócito.

O maior problema no estudo do processo de senescência advém da dificuldade em separar células de diferentes idades, numa população eritrocitária circulante normal. A maioria das metodologias desenvolvidas nesse sentido, fundamentam-se no facto de o envelhecimento celular se acompanhar de um aumento de densidade e de uma redução no volume do eritrócito. O valor de concentração de hemoglobina globular média (CHGM) é o principal determinante de distribuição eritrocitária nos métodos de separação por centrifugação. Assim, uma modificação precoce na densidade ou no VGM, determinará uma redução ou um aumento na CHGM, a qual determinará o posicionamento da célula, numa fracção que não corresponderá à sua idade cronológica. São, aliás, diversos os trabalhos em que se refere a observação de modificações características das células senescentes, em populações eritrocitárias menos densas^{8,9}. A maioria das metodologias desenvolvidas e aplicadas no estudo do processo de envelhecimento eritrocitário, envolvem um processo de separação por centrifugação, com base na diferença de densidade das células. Uma extensa variedade de meios de gradiente de densidade têm sido usados, tais como albumina bovina sérica, stractan II, dextranos, ficol e percol. Este último, constituído por partículas de sílica coloidal revestidas com polivinilpirrolidona, apresenta diversas vantagens sobre os restantes. A sua baixa viscosidade, pressão osmótica e atoxicidade permitem um fácil ajustamento às condições fisiológicas. Pode usar-se na preparação de gradientes de densidade contínua ou linear (self-generated) e descontínua¹⁰. Em animais são também usadas técnicas de supressão eritrocitária por policitemia induzida por hipertransfusão.

O envelhecimento de eritrócitos *in vitro* é considerado por diversos autores como um bom modelo de estudo do processo de envelhecimento eritrocitário *in vivo*, uma vez que a capacidade de sobrevivência de eritrócitos armazenados decresce ao longo do tempo e que as modificações adquiridas ao longo desse período, que comprometem a viabilidade da célula, são sobreponíveis às modificações descritas como resultantes de senescência *in vivo*. De facto, do estudo comparativo de células envelhecidas *in vitro*, com células de elevada densidade, diversas semelhanças têm sido observadas, nomeadamente a diminuição da relação área de superfície/volume, semelhança do perfil proteico da membrana obtido por electroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), aumento da ligação de auto-anticorpos à membrana¹¹. De forma análoga, foram observadas

semelhanças entre eritrócitos mais densos e eritrócitos com patologia associada a envelhecimento acelerado, tais como talassemias, drepanocitoses, esferocitoses, eliptocitoses, xerocitoses^{1,12,13}.

2. Modificações no eritrócito senescente

2.1. Disfunção Metabólica

2.1.1. *Variações na glicólise pela via de Embden-Meyerhof*

Na célula senescente a glicólise pela via EM, a via metabólica principal do eritrócito, produtora de ATP e NADH (nicotinamida adenina dinucleótido), faz-se a um ritmo mais lento, em consequência de uma redução na actividade das diversas enzimas que nele actuam. Esta redução não é valorizada por alguns autores, que a atribuem mais ao processo de maturação reticulocitária, que ao processo de envelhecimento celular, dada a dificuldade em obter células senescentes, mais densas, sem contaminação reticulocitária. Independentemente desta controvérsia, as células senescentes em condições de *stress* metabólico, são mais susceptíveis de depleção metabólica. Num ambiente pobre em glucose, como acontece na circulação esplénica, as células mais densas, rapidamente depletadas em ATP, são incapazes de resposta à estimulação metabólica imposta nessas condições. Todos os processos energético-dependentes do eritrócito, ficam comprometidos em caso de redução nos níveis de ATP disponível e, paralelamente, nos níveis de NADH e de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG). A importância do ATP e do 2,3-DPG para a viabilidade e preservação da principal função da célula, a oxigenação dos tecidos, é largamente evidenciada nas amostras de sangue colhidas para transfusão, em que se usa ACD (ácido citrato dextrose) ou CPD (citrato fosfato dextrose) como anticoagulante. O armazenamento destas amostras conduz a uma redução em ATP e 2,3-DPG, que está relacionada com a concentração hidrogeniônica e com a osmolaridade da solução anticoagulante. A depleção de ATP limita a acção das enzimas dele dependentes – ATPases – determinando a falência da bomba de sódio e potássio, do transporte de Ca^{++} , do transporte de glutatião oxidado (GSSG), de dissulfuretos mistos e conjugados de glutatião. O *stress* metabólico, por depleção em ATP, é acompanhado de um aumento na capacidade de ligação de imunoglobulinas G (IgG) à membrana eritrocitária. Este ponto é, todavia, controverso e pode estar associado a outras modificações que, por

si só ou em conjunto, determinam a ligação de anticorpos à membrana¹⁴. Durante o armazenamento, a depleção em ATP é progressiva e conduz a alterações na forma da célula, de discócito para esferócito, a perda de lípidos de membrana e a uma rigidez acrescida da membrana. Há, pois, uma perda progressiva da viabilidade celular, que é bem evidenciada pela remoção de células lesadas, após a reinfusão do sangue¹⁵.

O 2,3-DPG regula a afinidade da hemoglobina para o oxigénio, pelo que a sua redução significa um aumento da afinidade da hemoglobina para o oxigénio, comprometendo a libertação de oxigénio para os tecidos.

Em determinadas eritropatias, observa-se remoção precoce das células, provavelmente decorrente de um processo de envelhecimento celular acelerado, devido a um *stress* metabólico crónico. É o caso das alterações primárias da membrana eritrocitária, que são acompanhadas de um aumento da permeabilidade passiva ao Na^+ e ao K^+ , habitualmente de valor irrelevante. Este aumento de permeabilidade, cuja origem se desconhece, determina uma actividade acrescida das ATPases envolvidas no transporte activo do Na^+ e do K^+ , um aumento da glicólise e produção de ATP. O *stress* metabólico crónico nestas condições determinará uma depleção precoce dos sistemas enzimáticos, e, por consequência, em ATP, com falência das bombas catiónicas, hidratação e aumento de volume da célula. Paralelamente ao aumento da porosidade aos catiões, a célula, devido a uma composição proteica alterada, da membrana, sofre fragmentação, com diminuição da relação área de superfície/volume e perda de elasticidade e estabilidade da membrana.

À medida que a célula envelhece a capacidade de síntese de glutatião (GSH), via glutatião sintetase e gama glutamil cisteína sintetase, dependente de ATP, decresce e o GSSG acumula-se. Este aumento de GSSG pode inibir a actividade da hexocinase, limitando a glicólise e o fornecimento de energia¹⁶. A capacidade de defesa da célula senescente contra o ataque oxidativo de peróxidos ou outros oxidantes, bem como contra a acção tóxica de compostos electrofílicos de origem endógena ou exógena, está limitada e permite o desenvolvimento de um *stress* oxidativo, que poderá afectar os diversos componentes do eritrócito, nomeadamente a hemoglobina^{17,18}.

A produção de NADH na célula senescente será também mais reduzida, limitando a acção da enzima meta-hemoglobina redutase principal e, por consequência, a manutenção da hemoglobina no estado funcional.

A célula senescente é habitualmente mais densa e de menor volume. A densidade é definida pela CHGM. O conteúdo em hemoglobina mantém-se ao longo da vida, embora possam ocorrer perdas no decurso de fragmentação celular. A CHGM será, portanto, determinada pelo conteúdo hídrico da célula, que é regulado pela concentração intracelular de Na^+ e K^+ . As células senescentes contêm menos K^+ e mais Na^+ que as células mais jovens, o que parece resultar de uma maior porosidade da membrana aos cationes, à semelhança do que acontece nas eritropatias de membrana.

2.1.2. Variações na glicólise pela via das hexoses monofosfato

A via HMF, apesar de representar apenas 10% do metabolismo eritrocitário, é de extraordinária importância como defesa anti-oxidante, por constituir a única fonte de NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) na célula. A enzima-chave desta via metabólica é a glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), cuja actividade é regulável pelo NADPH disponível na célula. No eritrócito maduro a G6PD apresenta uma actividade que é cerca de 1% da sua capacidade máxima¹⁹, não constituindo, todavia, um factor limitante da via HMF, na medida em que possui capacidade para operar a um ritmo superior em situações de *stress* oxidativo. Ou seja, neste caso, a G6PD aumentará a sua actividade, no sentido de repor os níveis de NADPH e proteger o eritrócito contra o ataque oxidante. A estimulação da via HMF far-se-á em prejuízo da via EM, e a sua intensificação será função da natureza do agente oxidante e da respectiva concentração. Nas células senescentes, a G6PD apresenta uma actividade reduzida e, mais importante, uma capacidade de resposta ao *stress* oxidativo bastante inferior ao das células mais jovens²⁰. Os factores que afectam a via HMF em geral e a actividade da sua enzima-chave, a G6PD, em particular, são ainda hoje objecto de estudo, que se afigura, aliás, de grande importância para o esclarecimento do metabolismo no eritrócito normal e no eritrócito deficiente em G6PD. A importância desta enzima prende-se com o facto de a sua deficiência comprometer todo o metabolismo pela via HMF e de representar a eritroenzimopatia de maior prevalência mundial, afectando cerca de 100 milhões de pessoas. A grande maioria dos indivíduos portadores deste traço genético são assintomáticos e, frequentemente, desconhecem a sua existência até ao momento em que sofrem uma crise hemolítica. Este facto demonstra que na maioria dos casos a enzima

deficiente, operando com uma actividade muito próxima da sua capacidade máxima, consegue manter níveis compatíveis com a viabilidade celular. Todavia, falham, quando sujeitos a um *stress* oxidativo, dada a incapacidade de aumentar a actividade da G6PD. A crise hemolítica aguda pode ser desencadeada por medicamentos, por agentes químicos, por ingestão de favas ou por acidose diabética²¹. Em todos os casos, desenvolve-se no interior do eritrócito um *stress* oxidativo, que se deve à formação ou difusão de formas activas de oxigénio que, acumulando-se, exercem a sua acção oxidante sobre diferentes constituintes eritrocitários, marcando a célula para a morte. Infecções e viroses podem também desencadear crises hemolíticas, no deficiente em G6PD, que se devem ao *stress* oxidativo criado pela difusão, através da membrana eritrocitária, de peróxido de hidrogénio proveniente da activação de neutrófilos. De facto, eritrócitos deficientes em G6PD, quando incubados *in vitro* na presença de granulócitos e partículas de látex, sofrem uma redução nos níveis de GSH e do tempo de vida. Esta alteração não se verifica por incubação dos eritrócitos com granulócitos em «repouso», isto é, sem activação, ou ainda por incubação de eritrócitos normais com granulócitos e partículas de látex. Estas observações evidenciam a acção do peróxido de hidrogénio, produzido pelos neutrófilos durante o processo de activação para fagocitose das partículas de látex, sobre o eritrócito.

Considerando o que ocorre em caso de *stress* oxidativo na deficiência em G6PD e ainda nas células senescentes, com uma actividade enzimática inferior e uma capacidade limitada de resposta ao *stress* oxidativo, é razoável pensarmos que as células senescentes são passíveis de remoção precoce em caso de *stress* oxidativo e, ainda, que a restante população eritrocitária, embora capaz de ultrapassar a «crise», sofrerá e acumulará modificações que poderão abreviar a sua longevidade. Da mesma forma, situações que associem activação de neutrófilos determinarão um envelhecimento precoce da população eritrocitária. O metabolismo do glutatião é também sensível a qualquer modificação do metabolismo pela via HMF, apesar da reconhecida capacidade de síntese de GSH pelo eritrócito. Uma prolongada exposição a reduzidos níveis de GSH foi associada a lesões de natureza oxidativa da membrana eritrocitária, com redução da sua estabilidade²².

2.2. Modificações na membrana eritrocitária

As modificações na membrana, decorrentes do processo de senescência, surgem na sequência da

deterioração dos processos metabólicos e ainda por lesão mecânica, que será exacerbada logo que a capacidade de deformabilidade do eritrócito seja também limitada. Vários trabalhos evidenciam reduções no conteúdo em colesterol e fosfolípidos, hidratos de carbono e proteínas^{1,2,23,24}. Estas modificações parecem resultar da perda de área de superfície que se observa nas células senescentes, já que as proporções dos diversos componentes apresentam valores quase constantes¹. O mecanismo subjacente à perda de pequenas porções de membrana não está ainda perfeitamente esclarecido, embora o baço pareça ter um papel crucial. De facto, indivíduos esplenectomizados apresentam, relativamente aos não esplenectomizados, eritrócitos de volume superior, com um conteúdo lipídico superior na membrana, a qual apresenta pequenos «pits», com aspecto de vacúolos ou inclusões, cujo número aumenta à medida que a célula envelhece em circulação. Este facto indicia, portanto, o envolvimento do baço na remoção dos «pits», a qual é provavelmente acompanhada de perdas de membrana ou de sequestração e remoção eritrocitária.

No que respeita aos fosfolípidos, embora as proporções se mantenham, há, todavia, uma alteração na assimetria lipídica, com exteriorização dos aminofosfolípidos fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina, provavelmente decorrente de uma alteração no processo de interiorização dos mesmos^{2,25}.

2.2.1. Por depleção metabólica

A redução dos níveis de ATP e GSH, decorrentes do processo natural de senescência, ou de desequilíbrio metabólico em caso de *stress* oxidativo, determina um decréscimo da actividade dos sistemas de defesa anti-oxidante e da actividade das enzimas de membrana dependentes do ATP-ATPases. Gera-se um desequilíbrio electrolítico na célula, com diminuição de K⁺ e aumento do Na⁺ intracelular, que determinarão um menor conteúdo hídrico na célula, que se torna mais densa, com uma viscosidade interna acrescida e, por consequência, com uma capacidade de deformabilidade reduzida. A CHGM do eritrócito é já tão elevada que um pequeno aumento, por redução da água intracelular, determina um aumento substancial da viscosidade interna.

A lesão oxidativa de constituintes da membrana de eritrócitos depletados em ATP ou em GSH, ou ainda em ambos, é função do tipo de agente oxidante, da sua concentração e dos seus alvos preferenciais ou ocasionais. Coetzer *et al.*²⁶ mostraram que eritrócitos depletados em GSH (amostras de

indivíduos deficientes em G6PD), com níveis normais de ATP, apresentam agregação de proteínas da membrana, resultante da formação de pontes dissulfureto entre diferentes proteínas, como a espectrina, globina, banda 3 e outras, provavelmente citoplasmáticas. A depleção concomitante em GSH e ATP conduz também à formação destes agregados, mas, segundo o autor, a depleção nos níveis de ATP não é obrigatória para que ocorra a referida agregação. Mostraram ainda que, sob a acção de um agente oxidante exógeno (acetilfenil hidrazina), as células depletadas em GSH, mas não em ATP, apresentam também agregação proteica, todavia, a natureza destes agregados é distinta daqueles obtidos por acção de oxidantes de origem intracorpúscular. Neste caso, os agregados tinham como principal constituinte a globina e apresentavam pequenas quantidades de espectrina e de banda 3. Segundo os autores, o tamanho e frequência da agregação é função do número de colisões entre os grupos tiol das proteínas, da concentração do oxidante e do GSH. O ATP poderá desempenhar o papel de regulador da mobilidade das proteínas da membrana e não de preservação da interacção estável das proteínas da membrana.

A depleção em ATP determina um aumento na ligação de anticorpos à membrana, na sequência de modificações nesta, que traduzem a depleção metabólica¹⁴.

A concentração de cálcio intracelular não apresenta variações significativas, apesar de a actividade da Ca⁺⁺ATPase apresentar valores progressivamente mais baixos, por senescência. Todavia, por acção de um agente oxidante exógeno observa-se já em paralelo com um decréscimo de actividade da enzima, um aumento do Ca⁺⁺intracelular²⁷.

2.2.2. Por lesão oxidativa

A natureza e origem das lesões oxidativas da membrana, pela sua diversidade e inconsistência são controversas e pouco esclarecidas. Esta controvérsia está relacionada com o agente oxidante – concentração, tempo de actuação, poder oxidante, localização – e com o estado metabólico do eritrócito ou, mais precisamente, com a capacidade de resposta dos seus sistemas de defesa anti-oxidante. Um eritrócito senescente ou um eritrócito com um sistema de defesa anti-oxidante limitado, é sempre uma célula mais vulnerável que um eritrócito normal. E, mesmo no caso de eritrócitos normais, é razoável pensar que, sendo as enzimas envolvidas naqueles sistemas, de localização citoplasmática, podem não

impedir cabalmente lesões oxidativas a nível da membrana, quando o oxidante é libertado nas proximidades desta. Embora o eritrócito dependa predominantemente dos seus sistemas de defesa anti-oxidante na prevenção de lesões oxidativas da membrana, existem também na membrana proteases, que podem reconhecer e degradar proteínas oxidadas, incluindo a hemoglobina²⁸. Os reticulócitos possuem um sistema de proteólise para degradação de proteínas de estrutura alterada, dependente do ATP. Este sistema, também responsável pela eliminação programada de várias proteínas, no decurso do processo de maturação reticulocitária, está ausente no eritrócito²⁸. Nos reticulócitos e eritrócitos maduros actua um outro sistema proteolítico, independente do ATP, que está envolvido na degradação de proteínas alteradas por oxidação²⁹. O desenvolvimento na membrana eritrocitária, de polímeros de elevado peso molecular, de origem oxidativa, pode resultar de uma capacidade limitada deste sistema para a sua remoção proteolítica, ou de um ritmo oxidativo tão elevado, que aquele sistema proteolítico seja incapaz de o acompanhar.

O eritrócito pela sua especialização no transporte de oxigénio é uma célula equipada de um mecanismo de defesa anti-oxidante, o qual, em determinadas circunstâncias, pode, todavia, tornar-se vulnerável à acção oxidativa do oxigénio molecular. O estudo de células senescentes tem evidenciado a existência de lesões cumulativas, de natureza oxidativa, na membrana eritrocitária^{1,3,30,31}. A oxidação da hemoglobina a meta-hemoglobina, que se liga à membrana, aumenta progressivamente com a idade celular, em paralelo com a redução de GSH e o aumento em glutatião oxidado¹⁶. A desnaturação de hemoglobina é, aliás, frequente em determinadas patologias associadas com stress oxidativo (deficiência em G6PD e glutatião peroxidase), com envelhecimento celular acelerado e com hemoglobinopatias³². Nestes casos, a hemoglobina desnaturada é visível sob a forma de inclusões eritrocitárias, designadas por corpos de Heinz, de localização membranar. A meta-hemoglobina sofre pequenos rearranjos estruturais que podem levar à formação de hemicromos reversíveis ou, prosseguindo a desnaturação, de hemicromos irreversíveis, que irão constituir o núcleo para a formação de corpos de Heinz. Os hemicromos apresentam uma elevada afinidade para o domínio citoplasmático da proteína banda 3 da membrana, formando um copolímero reversível, mas insolúvel, que se amplifica rapidamente, atingindo dimensões macromoleculares^{31,33-35}. A maior frequência de corpos de Heinz em indivíduos esplenectomizados

mostra que a sua formação está relacionada com o processo de envelhecimento e remoção eritrocitária. A desnaturação da hemoglobina pode surgir na sequência da formação de metabolitos de oxigénio que, não sendo convertidos e eliminados sob a forma de água, por acção do metabolismo do glutatião que nas células senescentes e em determinadas eritropatias está comprometido, conduzem à formação de outros metabolitos de poder oxidante superior.

O aumento do sulfóxido de metionina na membrana de eritrócitos densos é outro sinal de lesão oxidativa da membrana e constitui um precoce marcador de senescência^{7,36}. De facto, a sua concentração em eritrócitos jovens é significativamente diferente da apresentada pelos eritrócitos de meia-idade; entre estes e os eritrócitos mais densos não há, todavia, diferença significativa. A oxidação da metionina inicia-se, portanto, muito cedo na vida do eritrócito, mantendo um valor mais ou menos constante a partir de um determinado período da vida da célula, o que poderá explicar-se pela degradação de proteínas altamente oxidadas ou, ainda, pela sua remoção no decurso do processo de fragmentação da membrana, que ocorre ao longo da vida da célula⁷.

O metabolismo do glutatião permite ao eritrócito manter os grupos tiol no estado reduzido. Todavia, a disfunção metabólica que acompanha o processo de senescência, torna os grupos tiol das proteínas da membrana susceptíveis à oxidação. De facto, as proteínas da membrana apresentam alterações conformacionais e uma redução dos grupos tiol, em paralelo com o aparecimento, nos electroforetogramas, de novas bandas de elevado peso molecular⁷.

Vários trabalhos *in vitro* foram elaborados com o objectivo de estudar a acção de diferentes oxidantes, em diferentes condições, sobre eritrócitos normais, senescentes e com determinadas patologias, por forma a clarificar o processo de senescência e de lesão oxidativa da membrana. Os agentes oxidantes podem actuar directamente sobre as proteínas da membrana, alterando a sua estrutura e tornando-as susceptíveis à degradação ou agregação, ou indirectamente, através dos produtos de oxidação lipídica como dienos conjugados, hidroperóxidos ou malonaldeído, capazes de promover modificações oxidativas nas proteínas da membrana eritrocitária^{29,37,38}.

Os sistemas produtores e de eliminação de formas activas de oxigénio no eritrócito, têm merecido especial atenção, dada a produção contínua de metabolitos de oxigénio, por autooxidação da hemoglobina. Como modificações impostas por es-

tes, podem salientar-se a redução de GSH e de NADPH, a oxidação da hemoglobina, proteólise, a formação de agregados de elevado peso molecular, a inibição de enzimas de transporte transmembranar ($\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPases}$, $\text{Ca}^{++}\text{ATPase}$), a lipoperoxidação, a redução na elasticidade e estabilidade da membrana e, finalmente, a hemólise^{1,3,30,31,39-43}.

O peróxido de hidrogénio é um peróxido hidrossolúvel produzido continuamente por autooxidação da hemoglobina, que em concentrações pré-hemolíticas determina modificações na permeabilidade ao K^+ , redução na capacidade de deformabilidade da membrana, oxidação da hemoglobina e sua ligação à membrana, e lipoperoxidação⁴². O t-butil hidroperóxido, um peróxido hidrófobo, tem já um efeito diferente sobre o eritrócito. A sua acção sobre a permeabilidade catiónica é mínima, assim como sobre a deformabilidade da membrana, verificando-se, todavia, uma redução na estabilidade da membrana. Efeitos tão díspares, de compostos quimicamente semelhantes, podem resultar de mecanismos e locais de acção também díspares.

Aos metabolitos de oxigénio são atribuídas modificações pouco consistentes e, por isso, controversas. Enquanto a exposição de eritrócitos ao hidroperóxido promove o «cross-linking» de proteínas de membrana, sem alteração de volume³⁹, a exposição de eritrócitos ao superóxido resulta em proteólise acentuada e aumento do volume celular. O aumento da permeabilidade da membrana, por alterações estruturais ou de degradação da banda 3, poderá justificar este aumento de volume celular. Observam-se também modificações na forma dos eritrócitos, evoluindo de discócitos para estomatócitos e, finalmente, para esferócitos. Estas modificações não se observam, todavia, em membranas isoladas e tratadas nas mesmas condições, evidenciando a importância da hemoglobina neste processo⁴⁴.

Outra acção dos metabolitos de oxigénio é a peroxidação dos lípidos de membrana. Os ácidos gordos poli-insaturados são decompostos por um processo de peroxidação directa ou indirecta de que resulta, como produto final, o malonildialdeído (MDA)^{1,12,32}. O MDA reage com o meio lipídico circundante mais próximo, que no caso serão os aminofosfolípidos do folheto interno da bicamada lipídica, para formar um aducto lipídico, resultante do «cross-linking» de fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina com os grupos aldeído do MDA³, em antecipação às bases de Schiff, que resultam da interacção do MDA com os grupos amina das proteínas da membrana eritrocitária. O MDA pode, para além destes produtos, promover o «cross-linking» de pro-

teínas por pontes dissulfureto, com eventual formação de agregados irreversíveis de elevado peso molecular⁴⁵. Estas modificações são referidas de uma forma inconsistente, na membrana de eritrócitos senescentes, de eritrócitos com enzimopatias, com hemoglobinopatias ou com patologia de membrana^{32,46}. Nos indivíduos esplenectomizados estas modificações intensificam-se, o que evidencia o envolvimento esplénico na sua remoção. Em consequência das modificações lipídicas e proteicas que acompanham a peroxidação de ácidos gordos insaturados, as propriedades físico-químicas da membrana eritrocitária modificam-se, com rigidificação da bicamada lipídica, estimulação dos movimentos verticais dos fosfolípidos e exteriorização dos aminofosfolípidos^{2,25}. A peroxidação lipídica da membrana senescente sugere depleção de anti-oxidantes da membrana eritrocitária. A vitamina E é um destes anti-oxidantes e o seu valor apresenta-se, de facto, reduzido, nas células senescentes, mais densas.

Se existe controvérsia quanto à natureza e origem das lesões oxidativas da membrana do eritrócito senescente, também ela existe no que se refere ao impacto destas modificações na morfologia, deformabilidade, viabilidade e longevidade da célula. Segundo alguns, as lesões oxidativas são acompanhadas de desestabilização da membrana, a qual se traduz numa redução da sua capacidade de deformabilidade, aumento da fragilidade osmótica, predisposição para a fragmentação, e eventualmente para uma longevidade abreviada²². O impacto da acção de um oxidante sobre a membrana eritrocitária, dependerá, não só dos múltiplos mecanismos de defesa anti-oxidante existentes na célula e que poderão proteger diferentes componentes da mesma, mas também de outros factores, nomeadamente o tipo de oxidante, a sua concentração, as concentrações dos diferentes componentes celulares, etc.

2.2.2.1. Por lesão oxidativa da banda 3

O tratamento de eritrócitos jovens com agentes oxidantes, como a fenilhidrazina e o «acridine orange», promovem a agregação da proteína banda 3 da membrana eritrocitária^{47,48}. O processo de oxidação pela fenilhidrazina inicia-se com a desnaturação da hemoglobina e formação de hemicromos, que têm uma grande afinidade para o domínio citoplasmático da banda 3³³. A associação destes com a banda 3 desencadeia a propagação da reacção, com formação de copolímeros de elevado peso molecular, que serão reconhecidos por auto-anticorpos anti-banda

3. O «acridine orange», sendo um oxidante lipofílico, não actua sobre a hemoglobina, mas somente sobre os constituintes da membrana. Todavia, promove igualmente a agregação irreversível da banda 3, a que se segue também o reconhecimento e ligação por auto-anticorpos; demonstra-se desta forma o envolvimento da banda 3 modificada, independentemente da desnaturação da hemoglobina, na ligação de auto-anticorpos à membrana eritrocitária. Estudos microscópicos por imunofluorescência e estudos por «immunoblotting», de eritrócitos tratados com oxidantes, corroborou este envolvimento, mostrando uma localização sobreponível dos anticorpos, dos agregados de banda 3 e dos corpos de Heinz^{47,49,50}. Os agregados de hemoglobina desnaturada ou hemicromos com banda 3 são característicos de eritrócitos senescentes, eritrócitos deficientes em G6PD, eritrócitos com um sistema de defesa antioxidante reduzido e ainda de eritrócitos com hemoglobinas instáveis^{22,31,32,41,45,46}. Sendo a banda 3 um dos pontos de ligação do citosqueleto com a bicamada lipídica, qualquer modificação na distribuição da banda 3 pode causar um desequilíbrio da estrutura da membrana. A mobilização lateral da banda 3, decorrente da agregação, poderá até criar áreas estritamente lipídicas na membrana, favorecendo a vesiculação da membrana^{51,52}.

2.2.3. Por proteólise

A membrana do eritrócito senescente apresenta lesões de natureza proteolítica. Ao contrário dos processos de lipoperoxidação e hemólise, a proteólise inicia-se rapidamente, após exposição a metabolitos de oxigénio; à semelhança da lipoperoxidação, processa-se numa forma linear em função do tempo e da concentração do agente oxidante, o que sugere que o processo de proteólise e de peroxidação lipídica, apesar de se processarem por mecanismos diferentes, possam ter uma interligação. É mesmo possível que a produção dos metabolitos de oxigénio no metabolismo eritrocitário tenha uma função fisiológica no despoletamento da degradação de proteínas modificadas ou de enzimas nocivas para a célula^{29,37}.

O mecanismo de acção e a natureza das proteases envolvidas na degradação de proteínas da membrana é ainda obscuro. Todavia, as alterações proteolíticas da membrana são de especial importância, por se relacionarem com o desenvolvimento do neoantigénio de senescência, que se liga a anticorpos presentes no plasma^{30,47,53}. Esta ligação será reconhecida pelos macrófagos que, em conjunto com o complemento, procedem à remoção da célula

por fagocitose. Os macrófagos são células do sistema fagocítico, responsáveis pela remoção de eritrócitos senescentes, e também uma importante fonte de formas activas de oxigénio e proteases. É pois razoável que um eritrócito, que sofreu repetidamente nos sinusóides a nível esplénico, hepático e da medula óssea, a acção de proteases, acumule e apresente modificações proteolíticas que se acentuarão ao longo da sua vida. De facto, eritrócitos com patologia de membrana, que atravessam os sinusóides mais lentamente, devido a uma reduzida capacidade de deformabilidade, apresentam, ainda jovens, essas modificações proteolíticas^{54,55}.

Os anticorpos isolados de eritrócitos mais densos foram relacionados imunologicamente com a banda 3 e com os seus fragmentos peptídicos, de menor peso molecular⁵⁶. Todavia, o tratamento de eritrócitos normais com diferentes enzimas proteolíticas, por si só, não induz a ligação de anticorpos isolados de células densas, o que evidencia a associação das modificações proteolíticas da banda 3 a outro(s) evento(s) eritrocitários, a nível da composição e estrutura da membrana e/ou do citoplasma¹. Gaczynska *et al.*^{54,55} mostraram que a susceptibilidade das proteínas da membrana eritrocitária à proteólise, é função da composição e estrutura das proteínas da membrana, da actividade das proteases de membrana e da idade da célula. A acção de proteases extracelulares parece ser diferente daquela apresentada pelas endoproteases, o que estará provavelmente relacionado com uma maior ou menor acessibilidade das proteínas às proteases⁵⁷.

Czerwinski *et al.*⁵⁶ prepararam no rato um anticorpo monoclonal designado por BIII 136, dirigido para um epítipo de aproximadamente 20 Kd, localizado no terminal amina do domínio citoplasmático da banda 3. Este anticorpo detecta com grande sensibilidade os polipeptídeos que contêm esse epítipo, permitindo o estudo proteolítico da banda 3 *in vivo* e *in vitro*. Reconhece a banda 3, três grupos de polipeptídeos de 55-60 Kd, 38-42 Kd e 21-26 Kd, habitualmente designados, para simplificação da linguagem, por 60 Kd, 40 Kd e 20 Kd, respectivamente, e, ainda, agregados de banda 3 ou dos respectivos polipeptídeos de menor peso molecular⁵⁸. A heterogeneidade da banda 3, bem evidenciada nas bandas difusas obtidas por SDS-PAGE, é atribuída à diferença de tamanho das cadeias de hidrato de carbono, embora alguns autores sugiram que se devem também a diferenças estruturais na cadeia polipeptídica⁵⁹. Os fragmentos polipeptídicos da banda 3 foram já detectados em membranas eritrocitárias como produtos de proteólise *in vivo*, como

produtos de autólise da membrana por acção de endoproteases⁶⁰ e como produtos da acção proteolítica de diferentes proteases como a tripsina, quimotripsina, pronase, elastase do neutrófilo, etc.⁵⁶. A proteólise da banda 3 *in vivo* poderá determinar a exposição do local antigénico designado por neoantigénio de senescência^{53,61}. Por outro lado, a degradação da banda 3 favorece a agregação⁵¹ por facilitar a sua movimentação lateral na membrana. Por sua vez, a agregação da banda 3 permitirá uma ligação bivalente dos anticorpos, que não era possível anteriormente⁶²⁻⁶⁴. De facto, o processo de senescência eritrocitária é acompanhado de agregação da banda 3, a qual parece iniciar os processos imunológicos conducentes à remoção por fagocitose^{30,48,49,64,65}.

2.3. Variações nas propriedades físicas

As diversas lesões bioquímicas que o eritrócito circulante sofre e acumula ao longo da sua vida, determinam alterações físicas na célula, nomeadamente, aumento da densidade e da fragilidade osmótica e mecânica e redução da capacidade de deformabilidade. A viscosidade intracelular acrescida e a redução da área de superfície do eritrócito senescente, são os factores limitadores da capacidade de deformabilidade e de alongação da célula^{65,66}. Inicialmente pensava-se que a perda de deformabilidade se devia a uma maior rigidez da membrana, todavia, estudos posteriores mostraram que esta se deve predominantemente ao aumento da viscosidade interna⁶⁵. A perda de deformabilidade determina uma circulação mais lenta através de vasos sanguíneos de pequeno diâmetro, como por exemplo no baço, ou mesmo a sequestração do eritrócito, se não conseguir deformar-se por forma a atravessá-los⁴⁴. Em determinadas doenças hemolíticas, como esferocitose, eliptocitose, doença das células falsiformes e anemias imuno-hemolíticas, a rigidez da membrana eritrocitária dificulta ou impede a passagem da célula através dos sinusóides esplénicos. A estase eritrocitária a nível esplénico, compromete a actividade metabólica do eritrócito e provoca a diminuição dos níveis de ATP e a falência das bombas catiónicas, de que resulta a perda de K⁺ e a instabilidade da membrana. Acresce que nestas patologias a célula está já sob *stress* metabólico, devido a um aumento da permeabilidade passiva ao Na⁺ e K⁺ ou a alterações na composição ou estrutura da membrana, que torna essas células particularmente sensíveis a um ambiente deficiente em glucose e de pH baixo. Ainda, o contacto prolonga-

do com macrófagos activados, de elevado poder oxidante e proteolítico, acentuará o *stress* metabólico e, por consequência, a depleção de K⁺, podendo exacerbar modificações oxidativas e proteolíticas na célula. Passagens consecutivas na circulação esplénica poderão determinar modificações cumulativas no eritrócito, até ao momento em que a célula é reconhecida como senescente, sendo então sequestrada e destruída.

A composição e estrutura da membrana são importantes determinantes da elasticidade e deformabilidade eritrocitária. A elasticidade da membrana assegura a deformação do eritrócito, quando sob a acção de uma força, e a recuperação da forma inicial, logo que cesse a mesma. A estabilidade da membrana refere-se à capacidade de deformabilidade sem rotura estrutural da membrana, isto é, sem fragmentação. A estabilidade da membrana depende essencialmente da integridade do citosqueleto, enquanto a elasticidade se relaciona primordialmente com perturbações estruturais e na interacção da espectrina com outras proteínas da membrana eritrocitária⁶⁸. Estudos em eritrócitos portadores de alterações hereditárias na estrutura e composição das proteínas do citosqueleto evidenciaram o envolvimento das proteínas integrais na elasticidade e estabilidade da membrana, já que as proteínas estruturais, por si só, não esclareciam e não eram coerentes com as observações referidas sobre o comportamento das membranas. De facto, a forte correlação entre a densidade da espectrina e da banda 3, com a elasticidade da membrana e, ainda, o facto de uma redução rotacional e translacional da banda 3, observada numa variante desta proteína, determinar uma redução na elasticidade e estabilidade da membrana, gerou controvérsia quanto ao papel das proteínas integrais nestas propriedades da membrana. A mobilidade reduzida da banda 3 inibe o movimento de alongação da molécula de espectrina, determinando rigidez da membrana⁶⁹. A deficiência em glicoforina C, outra proteína integral associada ao citosqueleto, não determina já rigidez.

Várias modificações físicas e químicas foram induzidas na membrana eritrocitária, no sentido de avaliar o seu efeito na elasticidade e estabilidade da membrana. Induziu-se o «cross-linking» de proteínas, quer especificamente sobre determinadas proteínas, quer sobre proteínas em geral, e em todos os casos se observou uma maior rigidez na membrana. Esta rigidificação, por «cross-linking» das proteínas, é lógica para qualquer modelo cuja elasticidade dependa do movimento relativo entre as suas moléculas. Todavia, o facto de a dissociação dos tetrámeros de

espectrina determinar uma maior rigidez da membrana veio lançar controvérsia nesta área e mostrou que a interacção das moléculas de espectrina e o seu impacto na elasticidade da membrana é mais complexa. Posteriormente, foi também referido que a ligação de anticorpos à membrana determinava um aumento da rigidez da membrana⁷⁰. No caso da glicoforina A, a sua ligação com o respectivo anticorpo anti-glicoforina A, induz uma redução da elasticidade da membrana devido a uma nova interacção entre o domínio citoplasmático desta proteína, com o citosqueleto. Este trabalho constituiu mais uma evidência de que a interacção de proteínas do citosqueleto com proteínas integrais podem modular a elasticidade e estabilidade da membrana.

A depleção metabólica do eritrócito senescente reflecte-se na sua capacidade de deformabilidade. A depleção em ATP pode modificar a viscosidade interna, por limitar a acção das ATPases, reguladoras da concentração iónica intracelular; por limitar a troca de fosfolípidos da membrana com o plasma e ainda o movimento de «flip-flop» fosfolipídico; por limitar os processos de fosforilação como dador de fósforo; por limitar a regulação de transglutaminases, etc. A depleção em GSH limitará os processos de desintoxicação da célula em produtos nocivos, nomeadamente em formas activas de oxigénio.

As propriedades físicas e químicas da membrana, apesar de determinadas de uma forma relevante pelas proteínas do citosqueleto, são também reflexo dos outros componentes da membrana, de uma equilibrada interacção molecular entre os diferentes constituintes da membrana e destes com o meio interno e externo e dos múltiplos mecanismos metabólicos do eritrócito.

2.4. Por ligação de auto-anticorpos

Kay¹¹ foi a primeira investigadora a mostrar que eritrócitos mais densos e eritrócito envelhecidos *in vitro*, apresentam auto-anticorpos ligados à sua membrana, os quais são imunoglobulinas do tipo IgG. Mostrou ainda que a presença destas IgG promove, *in vitro*, a fagocitose de eritrócitos senescentes, sugerindo o envolvimento destes anticorpos no processo de remoção eritrocitária. Singer *et al.*⁷¹ mostraram, algum tempo depois, que eritrócitos envelhecidos *in vivo*, usando como modelo experimental o rato hipertransfundido, apresentavam também auto-anticorpos ligados à sua membrana. Referiram ainda a sua quase ausência nas células jovens e corroboraram o envolvimento destes auto-anticorpos no pro-

cesso de desencadeamento da eritrofagocitose pelos macrófagos.

O auto-anticorpo de senescência não é um anticorpo inespecífico ou citofílico, mas sim uma IgG que se liga especificamente à célula senescente, pela região Fab e de uma forma cumulativa⁷². Um estudo *in vitro* com macrófagos esplênicos e eritrócitos autólogos, novos e velhos, de rato, mostrou que a fagocitose das células jovens era praticamente nula (5%) e que a dos eritrócitos de meia-idade (23%) se situa entre a destes e a dos eritrócitos senescentes (50%), o que sugere que o antigénio de senescência se desenvolve cumulativamente e que, atingido um determinado limiar, desencadeia a fagocitose⁶⁵. A modificação que tem lugar a nível da membrana e que determinará a ligação do auto-anticorpo, por se observar com maior predominância nas células senescentes e promover a ligação de auto-anticorpos que marcam a célula para a morte, tomou a designação de neoantigénio de senescência. A presença e o papel deste parece não se circunscrever à remoção fisiológica de eritrócitos senescentes. Nas anemias hemolíticas com patologia associada a envelhecimento acelerado observa-se uma ligação exacerbada desses auto-anticorpos^{12,13,73}. Também no decorrer do armazenamento sanguíneo e ainda em caso de lesão oxidativa eritrocitária se observa uma maior interacção com os mesmos auto-anticorpos. Esta interacção é também observada em leucócitos e plaquetas e, ainda, em células senescentes de outros tecidos^{74,75}.

A etiologia da modificação eritrocitária determinante da ligação de auto-anticorpos suscitou grande interesse e também controvérsia. Segundo alguns, a ligação de auto-anticorpos e a fagocitose requeria o desaparecimento dos resíduos terminais de ácido siálico das glicoproteínas da membrana e subsequente exposição dos penúltimos resíduos, de galactose^{76,77}. A natureza do neoantigénio de senescência ficou definitivamente esclarecida em 1981 por Kay⁷⁸, que isola o auto-anticorpo ligado à membrana de eritrócitos senescentes, por cromatografia de afinidade. Da eluição da coluna obteve, para além da IgG, um sialoglicopeptido com um peso molecular aproximado de 62 Kd, migrando na região da proteína 4.5. Kay verificou ainda a presença do mesmo polipeptido, em plaquetas, linfócitos e neutrófilos envelhecidos por armazenamento, bem como em células hepáticas e renais em cultura, e sugeriu que este mecanismo imunológico de remoção de eritrócitos senescentes ou lesados, possa constituir um processo fisiológico de remoção de células somáticas senescentes.

2.4.1. A relação do neoantígeno de senescência com a banda 3

Estabelecida a natureza glicoproteica do neoantígeno e considerando que o eritrócito é incapaz de sintetizar proteínas, o neoantígeno resultará de modificações numa proteína da membrana de peso molecular superior ao seu. Em conformidade, Kay *et al.* elaboraram um estudo⁶¹ que permitiu relacionar imunologicamente o neoantígeno com a proteína banda 3 da membrana. Tanto a banda 3 como o neoantígeno de senescência isolado de eritrócitos senescentes, após incubação com o anticorpo, anulam a capacidade indutora de fagocitose das IgG. O mesmo não se verificou com nenhuma das outras proteínas da membrana eritrocitária. Além disso, anticorpos dirigidos para a banda 3 e para o antígeno de senescência, produzidos em ratos, e IgG eluídas de células senescentes, reagem, quer com a banda 3, quer com os respectivos produtos de degradação, que incluem peptídeos de 60, 40 e 20 Kd. Ficou assim estabelecido que estas moléculas possuem determinantes antigénicos comuns, ausentes em qualquer outra proteína de membrana.

2.4.2. Identificação dos determinantes antigénicos da proteína banda 3

A identificação dos locais antigénicos da proteína banda 3 nos resíduos 538-554 e 788-827, ambos de localização extracelular, foi feita através de peptídeos sintéticos⁷⁹, cuja síntese foi executada de acordo com a sequência descrita⁷⁹. O resíduo 788-827 pertence ao terminal COOH e está implicado, bem como o outro, no transporte aniónico. Ambos apresentam aminoácidos que se ligam por covalência com o inibidor de transporte aniónico DIDS (diisotiociano dihidrostilbeno). Os hidratos de carbono que entram na composição da proteína, não estão envolvidos na antigenicidade da proteína banda 3, uma vez que a remoção dos determinantes antigénicos identificados na molécula, anulam completamente a capacidade de ligação de IgG. De resto, a disfunção do transporte aniónico nos eritrócitos senescentes fazia já supor que os determinantes antigénicos se localizariam a nível de peptídeos envolvidos no transporte aniónico. Da mesma forma, pressupunha-se a localização extracelular destes peptídeos, dado que a molécula de IgG com um peso molecular de 150 Kd só poderia interagir com um determinante antigénico localizado à superfície da membrana eritrocitária.

2.4.3. Exposição do neoantígeno e ligação dos auto-anticorpos

Os auto-anticorpos ligam-se a eritrócitos senescentes, eritrócitos envelhecidos *in vitro* e a eritrócitos lesados por oxidantes. Considerando o peso molecular do neoantígeno, seria de esperar que a sua exposição, por proteólise, promovesse a ligação ao auto-anticorpo. Todavia, a exposição de eritrócitos à acção proteolítica da quimiotripsina, com produção de dois fragmentos peptídicos, de 60 Kd e 40 Kd, não determina a ligação de IgG^{80,81}. Portanto, a ligação dos anticorpos não se deve a uma simples exposição do antígeno por proteólise, requerendo provavelmente outras modificações na membrana eritrocitária.

A proteína banda 3 nativa não reage com o auto-anticorpo, ao contrário do peptídeo de 62 Kd, identificado como neoantígeno de senescência. Todavia, quando desnaturada por um detergente aniónico, os auto-anticorpos anti-banda 3 reagem não só com a proteína, como com os seus produtos de degradação. A presença de fragmentos peptídicos de banda 3 na membrana dos eritrócitos circulantes, sugere que a proteólise desta proteína possa constituir uma modificação fisiológica associada ao processo de senescência e ser também iniciadora, ou não, da ligação de auto-anticorpos⁶⁵. As lesões bioquímicas desenvolvidas pelo eritrócito, à medida que envelhece, determinam directa ou indirectamente a ligação de auto-anticorpos anti-banda 3 à membrana. Também a depleção metabólica, as eritropatias determinantes de envelhecimento acelerado, o envelhecimento *in vitro*, ou, ainda, lesões oxidativas, determinam a ligação de auto-anticorpos anti-banda 3 à membrana e, em todos os casos, proteólise e agregação da banda 3. Alguns autores defendem que o neoantígeno de senescência resulta da agregação da banda 3 seguida de proteólise⁶⁵, enquanto outros defendem que a agregação da banda 3, resultante de lesão oxidativa, é a responsável pela exposição do neoantígeno de senescência e subsequente opsonização^{47,48,62,64,82}.

2.4.4. A agregação de banda 3 expõe o neoantígeno de senescência

A agregação de banda 3, que surge na sequência de diversas lesões bioquímicas incluídas no perfil bioquímico de senescência eritrocitária⁸³, induz posteriormente a sua opsonização por IgG. Nessas lesões incluem-se, entre outras, a depleção em ATP, formação de MDA, acumulação de Ca⁺⁺, lesões

oxidativas de proteínas, enfraquecimento do citoesqueleto, ligação de hemicromos à porção amino terminal da banda 3^{14,48}. Se a proteína banda 3 é modificada por lesões bioquímicas tão diversas, pode constituir o «tradutor» dos sinais de *stress* intracelular, para o exterior da célula. De facto, se as IgG reconhecem microscópicos agregados de banda 3, opsonizando-os, então, diferentes lesões bioquímicas podem ser detectadas e traduzidas para o sistema imune, por um simples marcador celular – a banda 3. Segundo Low¹⁴, o processo inicia-se com a desnaturação da hemoglobina, a qual pode ter origem em diversas lesões bioquímicas, sendo o eritrócito removido quando se apresente «modificado», independentemente da sua idade cronológica.

2.4.4.1. Desnaturação da hemoglobina causa agregação da banda 3

Embora a desnaturação da hemoglobina não seja a única alteração eritrocitária capaz de induzir a agregação de banda 3, parece todavia constituir o indutor principal. A hemoglobina desnaturada liga-se à porção aminoterminal da banda 3, promovendo a sua agregação^{33,48}. Estes agregados podem ser observados em eritrócitos com patologia associada a envelhecimento acelerado⁴⁹ e em eritrócitos isolados das fracções mais densas^{31,35}. A formação destes agregados pode ser induzida *in vitro*, por acção de desnaturantes da hemoglobina⁴⁷. Neste caso, a agregação de banda 3 induzida por um agente oxidante, como a fenilhidrazina, ou por um agregante directo da banda 3 (que não afecta a estabilidade da hemoglobina), promove sempre a ligação de IgG a esses agregados⁴⁷. De facto, vários agentes agregantes de proteínas integrais do eritrócito foram estudados e com todos eles se observou agregação de banda 3, seguida de ligação de IgG, fixação de complemento e fagocitose por macrófagos humanos. A inibição de qualquer um dos agentes agregantes, inibia também o desenrolar de todo este processo, ficando assim bem definido o papel crucial da agregação da banda 3 na «clearance» eritrocitária.

2.4.4.2. Agregados de banda 3 ligam anticorpos autólogos do tipo IgG

É reconhecido que a presença de imunocomplexos constituídos por agregados de banda 3 e IgG na membrana eritrocitária são reconhecidos como antigénios pelo sistema imune. A reduzida antigenicidade da banda 3 nativa, relativamente aos

respectivos agregados, constitui um tema de grande controvérsia. A agregação de banda 3 poderá ocorrer com deformação da proteína, que passará a expor epítomos antigénicos, que não expunha no estado nativo e que serão reconhecidos como estranhos pelo sistema imune. Outra hipótese será considerar que no processo de agregação se escondam epítomos, habitualmente expostos no eritrócito saudável, e se exponham outros, que serão reconhecidos como estranhos pelo sistema imune. Finalmente, deve ainda considerar-se que os anticorpos anti-banda 3 poderão apresentar uma baixa afinidade para a banda 3 e a ligação entre eles ser do tipo monovalente. A agregação da banda 3 pode modificar essa afinidade por aproximação de vários locais de ligação com o anticorpo, favorecendo-se assim a interacção antigénio-anticorpo e permitindo o estabelecimento de ligações bivalentes⁴⁸.

Os anticorpos anti-banda 3 estão normalmente presentes no soro humano, sendo anticorpos naturais auto-ímmunes^{14,53}.

2.4.5. A ligação de IgG autóloga promove a deposição de complemento

É reconhecido que a opsonização de um antigénio pelo respectivo anticorpo promove a fixação de complemento⁶⁴. A reacção de fixação de complemento favorece a remoção eritrocitária, todavia, o papel desempenhado pela deposição de complemento no processo de eritrofagocitose só ficou definitivamente estabelecida por Lutz *et al.*⁶², demonstrando que a inactivação do complemento presente no soro autólogo inibia largamente a fagocitose de células tratadas com diamida e opsonizadas com IgG anti-banda 3.

3. Remoção do eritrócito senescente

O estudo do processo de envelhecimento eritrocitário tem focado os mecanismos promotores de remoção e destruição, já que o eritrócito é removido em função da idade ou de lesões físicas ou químicas acumuladas. Muitas questões se colocam e permanecem sem resposta. Qual o impacto de cada uma das modificações decorrentes do processo de envelhecimento no despoletamento do processo de remoção? A célula «morre» devido a incapacidade metabólica ou é reconhecida especificamente e é removida antes de atingir um estado crítico de incapacidade funcional? Existem marcadores de senescência à superfície da célula que permitem o

seu reconhecimento. Como se desenvolvem? Com que rapidez aparecem? Há alguma interacção entre o processo de envelhecimento eritrocitário e a idade ou estado de saúde de cada indivíduo? A senescência é pré-determinada ou é simplesmente uma manifestação de lesões cumulativas irreparáveis? Estas são algumas das perguntas que se deparam a quem estuda o processo de remoção eritrocitária e para as quais não existem respostas definitivas.

É reconhecido que o destino último do eritrócito é ser fagocitado por uma célula do sistema mononuclear fagocítico alveolar no fígado, baço ou medula óssea. Desconhece-se, todavia, se a sua remoção ocorre depois da «morte funcional» da célula ou se a fagocitose é despoletada por um sinal de senescência desenvolvido à superfície da célula. São duas as hipóteses mais consideradas e estudadas. A primeira assume que a célula senescente é removida devido a uma disfunção intrínseca; a segunda considera que ocorrem alterações exofaciais no eritrócito senescente, que traduzem modificações citoplasmáticas e marcam a célula para a morte, antes que se atinja uma deterioração metabólica efectiva. Esta última é a hipótese que tem merecido mais consideração e atenção por parte dos investigadores nesta área de estudo. Segundo esta, a marcação do eritrócito é feita por exposição do neoantígeno de senescência, ao qual se liga o auto-anticorpo anti-banda 3, que estimula a deposição de complemento. Em conjunto, IgG e complemento, fornecerão os receptores necessários para que o macrófago possa distinguir entre um «eritrócito maduro» e um «eritrócito senescente» e proceda à sua remoção por fagocitose^{30,64,84}.

3.1. O auto-anticorpo natural anti-banda 3

A auto-imunidade tem sido estudada e avaliada como um estado de doença e não como um processo imunológico normal. Os auto-anticorpos têm, aliás, sido utilizados no diagnóstico e estudo das diversas patologias auto-imunes. A observação de auto-anticorpos anti-banda 3, em indivíduos saudáveis, veio revolucionar aquele princípio e criar novos interesses de investigação nesta área, com o fim de esclarecer o papel biológico destes auto-anticorpos. Segundo alguns, estão envolvidos no reconhecimento da alteração de antígenos «self» em células senescentes ou lesadas, constituindo um mecanismo homeostático específico^{11,30}.

Os auto-anticorpos naturais têm características particulares e distintas dos anticorpos associados a doenças auto-imunes. Entre estas, referem-se con-

centrações séricas baixas, reduzida afinidade para os locais antigénicos, interagindo com estes através de ligações monovalentes fracas, frequentemente com uma acção bi ou poli-específica. É reconhecida a existência de anticorpos naturais para a espectrina, para a banda 3, para os fosfolípidos e para o colesterol. Os dois primeiros foram já estudados quanto ao seu envolvimento na remoção eritrocitária, enquanto os últimos nunca foram estudados nesse âmbito. O envolvimento do anticorpo anti-banda 3 na opsonização, fagocitose e eventual remoção de eritrócitos senescentes *in vivo*, foi já reconhecido em diversos trabalhos^{30,62}. Este anticorpo anti-banda 3 existe no soro em reduzidas concentrações (50-1000 ng/ml) apresenta uma afinidade baixa para o antígeno e liga-se preferencialmente aos eritrócitos mais densos ou lesados. Estudos *in vitro* mostram que agressões do tipo oxidativo estimulam a ligação de auto-anticorpos, a deposição de complemento (C3b) e, finalmente, a fagocitose⁶².

A natureza ubiqüitária da proteína banda 3 e do seu anticorpo natural sugere um mecanismo homeostático imunológico para remoção de eritrócitos e células senescentes. De facto, a proteína banda 3 existe em diferentes células e tecidos (hepatócitos, células epiteliais, células alveolares dos pulmões, linfócitos, plaquetas, células do parênquima renal, neurónios, fibroblastos) e é também um constituinte habitual das membranas (membrana nuclear, membrana do aparelho de Golgi, das mitocôndrias e membrana celular)^{74,75,85}. Nas células nucleadas a proteína banda 3 exerce funções semelhantes às referidas no eritrócito. O estudo destas células revelou também o desenvolvimento do neoantígeno de senescência nas células senescentes⁷⁸. Além disso, os anticorpos do tipo IgG do soro humano mostraram interagir não só com os eritrócitos humanos, como também com os eritrócitos de rato, de murganho, de vaca, de coelho e de galinha⁶⁵. Portanto, o mecanismo imunológico para remoção de eritrócitos senescentes ou lesados, parece constituir um processo fisiológico para remoção de células programadas para a morte, nos mamíferos e, possivelmente, em outros vertebrados.

3.1.1. Concentração e afinidade do auto-anticorpo anti-banda 3

Os anticorpos naturais anti-banda 3 existem em reduzida concentração no soro e têm uma baixa afinidade para o respectivo antígeno. *In vitro*, a ligação óptima antígeno-anticorpo ocorre a concentrações elevadas e é acompanhada de deposição de com-

plemento e exacerbação de fagocitose. A concentração de anticorpo necessária para a indução do processo de fagocitose é 10 a 100 vezes superior ao valor sérico fisiológico do anticorpo anti-banda 3⁶². Inesperadamente, verificou-se que a concentração de anticorpo anti-banda 3, necessária para promover o mesmo processo, era consideravelmente mais baixa, após tratamento oxidativo de eritrócitos jovens, de que resultava, entre outras lesões oxidativas, a oligomerização de banda 3^{47,63}. Os eritrócitos apesar de jovens, por agressão oxidativa, adquirem capacidade para interagir com os auto-anticorpos naturais anti-banda 3. A exposição dos locais antigénicos parece depender mais de uma alteração topológica, que de uma modificação química⁶⁴.

3.1.2. A ligação bivalente do auto-anticorpo fortalece a ligação ao antigénio

A preferência dos auto-anticorpos anti-banda 3 para os oligómeros de banda 3, a presença de oligómeros de banda 3 nos imunoprecipitados de eritrócitos senescentes, a correlação positiva entre a ligação de IgG e o «cross-linking» de banda 3, e a ocorrência de agregados de banda 3 de elevado peso molecular em eritrócitos «oxidados», em conjunto, sugerem que os anticorpos anti-banda 3 adquirem funcionalidade por ligação bivalente ao antigénio que sofreu oligomerização^{1,62,64}. Nestes casos, a capacidade de ligação do auto-anticorpo anti-banda 3 pode aumentar para valores cerca de 1000 vezes superiores àqueles apresentados pela proteína nativa^{30,47}. A ligação bivalente é estabelecida entre o anticorpo e a banda 3 oligomerizada, em concentrações tão baixas que se a ligação fosse do tipo monovalente ocorreria facilmente a dissociação. A ligação do anticorpo pela região Fab fornece receptores para os macrófagos – a região Fc⁷². Todavia, o número de receptores oferecidos pelas IgG anti-banda 3 não são em número suficiente para promover o reconhecimento pelo macrófago. A opsonização da banda 3 constitui, pois, a primeira etapa na aquisição de funcionalidade do anticorpo, mas não a suficiente para promover a fagocitose do eritrócito senescente ou lesado.

3.1.3. Anticorpos anti-banda 3 estimulam a deposição de complemento (C3b)

A etapa seguinte, que permitirá adquirir e fornecer receptores em número suficiente para o reconheci-

mento da célula lesada, pelo macrófago, será a deposição de complemento^{64,86}. Vários anticorpos estimulam a deposição de complemento, todavia, o anticorpo anti-banda 3 pertence a um pequeno grupo que estimula a deposição de complemento pela via alternativa³⁰. A importância do C3b como opsonina na remoção de eritrócitos senescentes ou lesados foi durante algum tempo questionada. Todavia, diferentes laboratórios evidenciaram o envolvimento da deposição de C3b no processo de fagocitose e remoção de eritrócitos *in vitro* ou *in vivo*^{63,64,87}. O mecanismo de interacção parece envolver a deposição preferencial de C3b ao imunocomplexo constituído pelas IgG e oligómeros de banda 3, através de uma ligação covalente com a IgG. O tipo de ligação estabelecida entre o C3b e o imunocomplexo (anti-banda 3/oligómero de banda 3) é controversa. É reconhecida, todavia, a sua interacção preferencial com um local perto da região de ligação do anticorpo ao antigénio e que a ligação parece fazer-se com a porção (Fab)₂ da IgG e não com a porção Fc. A preferência do C3b pelos anticorpos anti-banda 3 é de extrema importância funcional, pois permite a intensificação selectiva do sinal de senescência ou de lesão eritrocitária. A opsonização pelo complexo (C3b-anti-banda 3), que se liga de forma bivalente a oligómeros de banda 3, medeia e pode desencadear o processo de reconhecimento e remoção da célula senescente ou lesada, por activação dos receptores FcR e CR1 dos fagócitos⁸⁶. No decorrer do processo pode ocorrer inactivação do C3b (iC3b). Neste caso, a fagocitose envolverá para além do receptor FcR, um receptor diferente para o iC3b, o receptor CR3 e decorre na presença de catiões bivalentes, como o ião cálcio e magnésio.

A forma como os anticorpos anti-banda 3 adquirem funcionalidade permite compreender não só a remoção de eritrócitos senescentes, como também a remoção prematura de eritrócitos portadores de determinadas patologias, que associam frequentemente anemia. Efectivamente, nestes casos, é reconhecida uma maior opsonização dos eritrócitos por anticorpos anti-banda 3^{35,49} e, em alguns casos, foi possível detectar um aumento no complexo (C3b-anti-banda 3)⁴⁹.

Em suma, os anticorpos anti-banda 3 são auto-anticorpos naturais, com propriedades distintas dos anticorpos induzidos. A reduzida afinidade para a proteína banda 3 permite-lhes fazer a distinção entre eritrócito maduro e eritrócito senescente ou lesado. A oligomerização da banda 3 determina um aumento dessa afinidade e inicia a ligação do auto-anticorpo. A interacção do auto-anticorpo anti-

banda 3 com o respectivo antígeno é, portanto, controlada por modificações intracelulares, que são traduzidas para a superfície celular por oligomerização da banda 3.

4. Bibliografia

- Clark, M.R. – Senescence of red blood cells: progress and problems. **Physiol. Rev.** 68, 1988, 503-554.
- Herrmann, A.; Devaux, P.F. – Alteration of aminophospholipid translocase activity during *in vivo* and artificial aging of human erythrocytes. **Biochim. Biophys. Acta**, 1027, 1990, 41-46.
- Jain, S.K. – Evidence for membrane lipid peroxidation during *in vivo* aging of human erythrocytes. **Biochim. Biophys. Acta**, 937, 1988, 205-210.
- Lorand, L.; Weissman, L.B.; Epel, D.L.; Bruner-Lorand, J. – Role of the intrinsic transglutaminase in the Ca^{2+} – mediated crosslinking of erythrocyte proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 73, 1976, 4479-4482.
- Barber, J.R.; Clarke, S.J. – Membrane protein carboxyl methylation increases in human erythrocyte age. Evidence for an increase in the number of methylatable sites. **Biol. Chem.** 258, 1983, 1189-1196.
- Williamson, J.R.; Gardner, R.A.; Boylan, C.W.; Carrol, G.L.; Chang, K.; Marvel, J.S.; Gonen, B.; Kilo, C.; Tran-Son-Tay, R.; Sutura, S.P. – Microrheologic investigation of erythrocyte deformability in diabetes mellitus. **Blood** 65, 1985, 283-288.
- Brovelli, A.; Castellana, M.A.; Minetti, G.; Piccinini, G.; Seppi, C.; Balduini, C.; Renzis, M.R.; Balduini, C. – Conformational changes and oxidation of membrane proteins in senescent human erythrocytes, em **Red Blood Cell Aging**, Ed. M. Magnani e A. DeFlora, Plenum Press, New York, 1991, 59-73.
- Clark, M.R.; Sorette, M.P. – Characterization of antibody that binds *in vivo* to normal human red blood cells, em **Red Blood Cell Aging**, Ed. M. Magnani e A. DeFlora, Plenum Press, New York, 1991, 357-365.
- Ferroni, L.; Giuliani, A.; Marini, S.; Caprari, P.; Salvati, A.M.; Condo, S.C.; Ramacci, M.T.; Giardina, B. – A new monoclonal antibody to an age sensitive band 3 transmembrane segment em **Red Blood Cell Aging**, Ed. M. Magnani e A. DeFlora, Plenum Press, New York, 1991, 351-356.
- Mackie, L.H.; Frank, R.S.; Hochmuth, R.M. – Erythrocyte density separation on discontinuous «Percoll» gradients. **Biorheol.** 24, 1987, 227-230.
- Kay, M.M.B. – Mechanisms of removal of senescent cells by human macrophages *in situ*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 72, 1975, 3521-3525.
- Hebbel, R.P.; Miller, W.J. – Phagocytosis of sickle erythrocytes: immunological and oxidative determinants of hemolytic anemia. **Blood** 64, 1984, 733-741.
- Green, G.A.; Rehn, M.M.; Kalra, V.K. – Cell-bound autologous immunoglobulin in erythrocyte subpopulations from patients with sickle cell disease. **Blood** 65, 1985, 1127-1133.
- Muller, H.; Lutz, H.U. – Binding of autologous IgG to human red blood cells before and after ATP depletion. Selective exposure of binding sites (autoantigens) on spectrin free vesicles. **Biochim. Biophys. Acta** 729, 1983, 249-257.
- Contreras, M.; Hewitt, P. – **Post graduate Hematology**, Ed. Hoffbrand, A.V., Lewis, S.M., Heinemann Medical Books, 1990, 269-293.
- Imanishi, H.; Nakai, T.; Abe, T.; Takino, T. – Glutathione metabolism in red cell aging. **Mech. Ageing Develop.** 32, 1985, 57-62.
- Labelle, E.F.; Singh, S.V.; Srivastava, S.K.; Awatshi, Y.C. – Dinitrophenyl glutathione efflux from human erythrocytes is primary active ATP-dependent transport. **Biochem. J.** 238, 1986, 443-449.
- Sharma, R.; Gupta, S.; Ahmad, H.; Ansari, G.A.S.; Awatshi, Y.C. – Stimulation of human erythrocyte membrane ATPase by glutathione conjugates. **Toxicol. Applied Pharmacol.** 104, 1990, 421-428.
- Rosemeyer, M.A. – The biochemistry of G6PD, 6PGD and glutathione reductase. **Cell Biochem. Function** 5, 1987, 79-83.
- Ouwkerk, R.; Damen, P.; Haan, K.; Staal, G.E.J.; Rijksen, G. – hexose monophosphate shunt activity in erythrocytes related to cell age. **Eur. J. Hematol.** 43, 1989, 441-447.
- Luzzatto, L.; Battistuzzi, G. – Glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Adv. Hum. Genet.** 14, 1985, 217-222.
- Johnson, R.M.; Ravindranath, Y.; El-Alfy, M.; Goyette, Jr. G. – Oxidant damage to erythrocyte membrane in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: correlation with *in vivo* reduced glutathione concentration and membrane protein oxidation. **Blood** 83, 1994, 1117-1123.
- Winterbourn, C.C.; Batt, R.D. – Lipid composition of human reds cells of different ages. **Biochim. Biophys. Acta** 202, 1970, 1-8.
- Schlepper-Schafer, J.; Kolb-Bachofen, V.; Kolb, H. – Identification of a receptor for senescent erythrocytes on liver macrophages. **Biochim. Biophys. Res. Comm.** 115, 1983, 551-559.
- Connor, J.; Schroit, A.J. – Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells. **J. Biol. Chem.** 269, 1994, 2399-2404.
- Coetzer, T.; Zail, S. – Membrane protein complexes in GSH-depleted red cells. **Blood** 56, 1980, 159-167.
- DeFlora, A.; Benatti, U.; Guida, L.; Forteleoni, G.; Meloni, T. – Favism: disordered erythrocyte calcium homeostasis. **Blood** 66, 1985, 294-297.
- Fagan, J.M.; Waxman, L.; Goldberg, A.L. – Red blood cells contain a pathway for the degradation of oxidant-damaged hemoglobin that does not require ATP or ubiquitin. **J. Biol. Chem.** 261, 1986, 5705-5715.
- Davies, K.J.A. – protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. **J. Biol. Chem.** 262, 1987, 9895-9901.
- Lutz, H.U. – Erythrocyte clearance, em **Blood Cell Biochemistry**, Ed. J.R. Harris, 1990, 81-120.
- Kanan, R.; Yuan, J.; Low, P.S. – Isolation and partial characterization of antibody and globin-enriched complexes from membranes of dense human erythrocytes. **Biochem. J.** 278, 1991, 57-62.
- Flynn, T.P.; Allen, D.W.; Johnson, J.G.; White, J.G. – Oxidant damage of the lipids and proteins of the erythrocyte membranes in unstable hemoglobin disease. Evidence for the role of peroxidation. **J. Clin. Invest.** 71, 1983, 1215-1223.
- Waugh, S.M.; Low, P.S. – Hemichrome binding to band 3: nucleation of Heinz bodies on the erythrocyte membrane. **Biochem. J.** 24, 1985, 34-39.
- Waugh, S.M.; Walder, J.A.; low, P.S. – Partial characterization of the copolymerization reaction of erythrocyte membrane band 3 with hemichromes. **Biochem. J.** 26, 1987, 1777-1783.
- Kannan, R.; Labotka, R.; Low, P.S. – Isolation and characterization of the hemichrome-stabilized membrane protein aggregates from sickle erythrocytes. **J. Biol. Chem.** 263, 1988, 13766-13773.
- Castellana, M.A.; Piccinini, G.; Minetti, G.; Seppi, C.; Balduini, C. – Oxidation of membrane proteins and functional activity of band 3 in human red cell senescence. **Arch. Gerontol. Geriatr. suppl.** 3, 1992, 101-110.
- Davies, K.J.A.; Goldberg, A.L. – oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. **J. Biol. Chem.** 262, 1987, 8220-8226.
- Beppu, M.; Takanashi, M.; Murikami, K.; Kato, T.; Kikugawa, K. – Modification of glyophorin A during oxidation of erythrocyte membrane. **Biochim. Biophys. Acta** 1023, 1990, 413-420.
- Corry, W.D.; Meiselman, H.J.; Hochstein, P. – t-Butyl hydroperoxide-induced changes in the physicochemical properties of human erythrocytes. **Biochim. Biophys. Acta** 597, 1980, 224-234.

40. Pfafferott, C.; Meiselman, H.J.; Hochstein, P. – The effect of malonyldialdehyde on erythrocyte deformability. **Blood** 59, 1982, 12-15.
41. Bates, D.A.; Winterbourn, C.C. – Haemoglobin denaturation, lipid peroxidation and haemolysis in phenylhydrazine-induced anaemia. **Biochim. Biophys. Acta** 798, 1984, 84-87.
42. Chen, M.-J.; Sorette, M.P.; Chiu, D. T.-Y.; Clark, M.R. – Pre-hemolytic effects of hydrogen peroxide and t-butylhydroperoxide on selected red cell properties. **Biochim. Biophys. Acta** 1066, 1991, 193-200.
43. Rohn, T.T.; Hinds, T.R.; Vincenzi, F.F. – Inhibition of the Ca pump of intact red blood cells by t-butyl hydroxyperoxide: importance of glutathione peroxidase. **Biochim. Biophys. Acta** 1153, 1993, 67-76.
44. Uyesaka, N.; Hasegawa, S.; Ishioka, N.; Ishioka, R.; Shio, H.; Schehter, A.N. – Effects of superoxide anions on red cell deformability and membrane proteins. **Biorheol.** 29, 1992, 217-229.
45. Jain, S.K.; Hochstein, P. – Polymerization of membrane components in aging red blood cells. **Biochim. Biophys. Res. Comm.** 92, 1980, 247-254.
46. Giuliani, A.; Marini, S.; Ferroni, L.; Condo, S.G.; Ramacci, M.T.; Giardina, B. – Anion exchange protein (band 3) in human erythrocytes characterized by different abnormalities. **Clin. Chim. Acta** 220, 1993, 211-217.
47. Low, P.S.; Waugh, S.M.; Zinke, K.; Drenckhahn, D. – The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging. **Science** 227, 1985, 531-533.
48. Low, P.S. – Role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in initiating red cell removal, em **Red Blood Cell Aging**, Ed. M. Magnani e A. DeFlora, Plenum Press, New York, 1991, 173-183.
49. Schluter, K.; Drenckhahn, D. – Co-clustering of denatured hemoglobin with band 3: its role in binding of autoantibodies against band 3 to abnormal and aged erythrocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 83, 1986, 6137-6141.
50. McPherson, R.A.; Sawyer, W.H.; Tilley, L. – Rotational diffusion of the erythrocyte integral membrane protein band 3: effect of hemichrome binding. **Biochem.** 31, 1992, 512-518.
51. Tsuji, A.; Ohnishi, S.-I. – Restriction of the lateral motions of band 3 in the erythrocyte membrane by the cytoskeletal network: dependence on spectrin association state. **Biochem.** 25, 1986, 6133-6139.
52. Liu, S.-C.; Derick, L.H.; Zhai, S.; Palek, J. – Uncoupling of the spectrin-based skeleton from the lipid bilayer in sickled red cells. **Science** 252, 1991, 574-576.
53. Kay, M.M.B. – Localization of senescent red cell antigen on band 3. **Proc. natl. Acad. Sci.** 81, 1984, 5753-5757.
54. Gaczynska, M.; Bartosz, G.; Judkiewicz, L.; Rosin, J. – Abnormal degradation of erythrocyte membrane proteins in hereditary spherocytosis. **Clin. Chim. Acta** 168, 1987, 7-11.
55. Gaczynska, M.; Bartosz, G.; Judkiewicz, L. – Changes in proteolytic susceptibility of erythrocyte membrane proteins in hereditary spherocytosis. **Clin. Chim. Acta** 198, 1991, 267-270.
56. Czerwinski, M.; Wasniowska, K.; Steuden, I.; Duk, M.; Viedlocha, A.; Lisowska, E. – Degradation of the human erythrocyte membrane band 3 studied with the monoclonal antibody directed against an epitope on the cytoplasmatic fragment of band 3. **Eur. J. Biochem.** 174, 1988, 647-654.
57. Gaczynska, M. – Changes in the proteolytic activity of human erythrocyte membrane during red cell aging. **Biochim. Biophys. Acta** 981, 1989, 173-177.
58. Jennings, M.L.; Anderson, M.P.; Monaghan, R. – Monoclonal antibodies against human erythrocyte band 3 protein. Localization of proteolytic cleavage sites and stilbenedisulfonate-binding lysine residues. **J. Biol. Chem.** 261, 1986, 9002-9010.
59. Low, P.S. – Structure and function of the cytoplasmic domain of band 3: center of erythrocyte membrane-peripheral protein interactions. **Biochim. Biophys. Acta** 864, 1986, 145-167.
60. Golovtchenko-Matsumoto, A.M.; Matsumoto, I.; Osawa, T. – Degradation of band-3 glycoprotein *in vitro* by a protease isolated from human erythrocyte membranes. **Eur. J. Biochem.** 121, 1982, 463-467.
61. Kay, M.M.B.; Goodman, S.R.; Sorensen, K.; Whitfield, C.F.; Wong, P.; Zaki, L.; Rudloff, V. – Senescent cell antigen is immunologically related to band 3. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 80, 1983, 1631-1635.
62. Lutz, H.U.; Bussolino, F.; Flepp, R.; Fasler, S.; Stammli, P.; Kasatchkine, M.D.; Aresé, P. – Naturally occurring anti-band-3-antibodies and complement together mediate phagocytosis of oxidatively stressed human erythrocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 84, 1987, 7368-7372.
63. Lutz, H.U.; Stammli, P.; Kock, D.; Taylor, R.P. – Opsonic potential of C3b-anti-band 3 complexes when generated on senescent and oxidatively stressed red cells or in fluid phase; em **Red Blood Cell Aging**, Ed. M. Magnani e A. DeFlora, Plenum Press, New York, 1991, 367-376.
64. Lutz, H.U. – Naturally occurring anti-band 3 antibodies: their dual specificity in providing potency, in **Progress in Cell Research**, Ed. E. Bamberg e Hu. Passow, Elsevier Science Publishers V.B., 1992, 239-243.
65. Kay, M.M.B.; Marchaloni, J.J.; Schluter, S.F.; Bosman, G. – Human erythrocyteag:in: celular and molecular biology. **Transf. Med. Rev.** 3, 1991, 173-195.
66. Nash, G.B.; Gratzler, W.B. – Structural determinants of the rigidity of the red cell membrane. **Biorheol.** 30, 1993, 397-407.
67. Bosh, F.H.; Werre, J.M.; Schipper, L.; Roerdinkholder-Stoelwinder, B.; Huls, T.; Willekens, F.L.A.; Wichers, G.; Halie, M.R. – Determinants of red blood cell deformability n relation to cell age. **Eur. J. Haemtol.** 52, 1994, 35-41.
68. Chasis, J.A.; Mohandas, N. – Erythrocyte membrane deformability and stability: two distinct membrane properties that are independently regulated by skeletal protein associations. **J. Cell Biol.** 103, 1986, 344-350.
69. Schofield, A.E.; Tanner, M.J.A.; Pinder, J.C.; Clough, B.; Bayley, P.M.; Nash, G.B.; Dluzewski, A.R.; Reardon, D.M.; Cox, T.M.; Wilson, R.J.M.; Gratzler, W.B. – Basis of unique red cell membrane properties in hereditary ovalocytosis. **J. Mol. Biol.** 223, 1992, 949-958.
70. Chasis, J.A.; Reid, M.E.; Jensen, R.H.; Mohandas, N.; Martincic, K. – Signal transductin by glycophorin A: role of extracellular and cytoplasmic domains in a modulatable process. **J. Cell Biol.** 107, 1988, 1352-1357.
71. Singer, J.A.; Jennings, L.K.; Jackson, C.W.; Dockter, M.E.; Morrison, M.; Walker, W.S. – Erythrocyte homeostasis: antibody-mediated recognition of the senescent state by macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 83, 1986, 5498-5501.
72. Khansari, N.; Fudenberg, H.H. – Phagocytosis of senescent erythrocytes by autologous monocytes: requirement of membrane-specific autologous IgG for immune elimination of aging red blood cells. **Cell Immunol.** 78, 1983, 114-121.
73. Yuan, J.; Kannan, R.; Shinar, E.; Rachmilewitz, E.A.; Low, P.S. – Isolation, characterization, and immunoprecipitation studies of immune complexes from membranes of β -thalassemic erythrocytes. **Blood** 79, 1992, 3007-3013.
74. Kay, M.M.B. – Band 3 in aging and neurological disease. **Ann. New York Acad. Sci.** 621, 1991, 179-204.
75. Kay, M.M.B.; Hughes, J.; Zagon, I.; Lin, F. – Brain membrane protein band 3 performs the same functions as erythrocyte band 3. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 88, 1991, 2778-2782.
76. Galili, U.; Clark, M.R.; Shohet, S.B. – Excessive binding of natural anti-alpha-galactosyl immunoglobulin G to sicle erythrocytes may contribute to extravascular cell destruction. **J. Clin. Invest.** 77, 1986, 27-33.
77. Beppu, M.; Misukami, A.; Ando, K.; Kikugawa, K. – Antigenic determinants of senescent antigen of human erythrocytes are located in sialylated carbohydrate chains of band 3 glycoprotein. **J. Biol. Chem.** 267, 1992, 14691-14696.
78. Kay, M.M.B. – Isolation of the phagocytosis-inducing IgG-binding antigen on senescent somatic cells. **Nature** 289, 1981, 491-494.
79. Kay, M.M.B.; Marchaloni, J.J.; Hughes, J.; Watanabe, K.; Schluter, S.F. – Definition of a physiologic aging autoantigen by using synthetic peptides of membrane protein band 3: localization of th active antigenic sites. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 87, 1990, 5734-5738.

80. Steck, T.L.; Ramos, B.; Strapazon, E. – Proteolytic digestion of band 3 predominant transmembrane polypeptide of the human erythrocyte membrane. **Biochem.** 15, 1976, 1154-1161.
81. Steck, T.L.; Koziarz, J.J.; Singh, M.K.; Reddy, G.; Kohler, H. – Preparation and analysis of seven major, topographically defined fragments of band 3, the predominant transmembrane polypeptide of human erythrocyte membrane. **Biochem.** 17, 1978, 1216-1222.
82. Lutz, H.U. – Naturally occurring anti-band 3 antibodies. **Transf. Med. Rev.** 6, 1992, 201-211.
83. Corbett, J.D.; Golan, D.E. – Band 3 and glycophorin are progressively aggregated in density-fractionated sickle and normal red blood cells. Evidence from rotational and lateral mobility studies. **J. Clin. Invest.** 91, 1993, 208-217.
84. Turrini, F.; Arese, P.; Yuan, J.; Low, P.S. – Clustering of integral membrane proteins of the human erythrocyte membrane stimulates autologous IgG binding, complement deposition, and phagocytosis. **J. Biol. Chem.** 266, 1991, 23611-23613.
85. Goodman, J.R.; Gamble, D.; Kay, M.M.B. – Distribution and function of multiple anion transporter proteins in brain tumor cell lines in relation to glucose transport. **Brain Res. Bull.** 33, 1994, 411-417.
86. Fries, L.F.; Siwik, S.A.; Malbran, A.; Frank, M.M. – Phagocytosis of target particles bearing C3b-IgG covalent complexes by human monocytes and polymorphonuclear leukocytes. **Immunol.** 62, 1987, 45-51.
87. Szymanski, J.O.; Odgren, P.R.; Valeri, C.R. – Relationship between the third component of human complement (C3) bound to stored preserved erythrocytes and their viability *in vivo*. **Vox Sang.** 49, 1985, 34-41.

O clima interior dos hospitais da Universidade de Coimbra

Resultados do «Questionnaire Örebro»

J.J. Amaral-Mendes*

K. Andersson**

Otávio Lopes†*** e Ivone Teles***

Como testemunho de Homenagem ao Professor Robalo Cordeiro, Faculdade de Medicina de Coimbra

RESUMO

Um questionário estandardizado (MMO40 EA) desenvolvido no Medical Center Hospital, Örebro, Suécia, utilizado em muitos países, especialmente nos países nórdicos, foi usado para avaliar a qualidade do clima interior, tal como era sentida pelo pessoal hospitalar dos hospitais da Universidade de Coimbra (HUC). Este estudo pode englobar-se no que hoje é designado pela análise do Síndrome dos Edifícios Insalubres (Sick Building Syndrome).

O questionário foi enviado a 15 serviços, pré-seleccionados, do hospital, um edifício monobloco com nove anos de existência. O questionário foi também enviado para a Maternidade, um edifício hospitalar mais antigo, com cerca de 30 anos de existência. Dum total de 1298 pessoas dos 15 serviços seleccionados, 582 responderam ao questionário, o que dá uma taxa de resposta de 44,8%. Na maternidade com um total de 180 pessoas, 145 responderam o que dá uma taxa de resposta de 80,6%.

O questionário cobria questões sobre factores ambientais perturbadores (temperatura, qualidade do ar, cheiros desagradáveis, fumadores passivos, ruído e luminosidade), sintomas e sua presumível relação com o ambiente hospitalar e outros factores de fundo (background) como idade, sexo, ocupação, hábitos tabágicos e história de alergia. O pessoal hospitalar foi dividido em quatro categorias (médicos, enfermeiros, administrativos e serviços).

No estudo efectuado no Hospital verifica-se que as prevalências para o ruído, para as temperaturas não óptimas e para os cheiros desagradáveis, são relativamente elevadas e muito mais elevadas que os valores de referência.

Os padrões de queixas para homens e mulheres foram semelhantes, apresentando contudo as mulheres uma prevalência significativamente mais elevada dos sintomas que os homens. Foram ainda significativas as diferenças encontradas nas prevalências da sintomatologia entre fumadores/não fumadores, entre alérgicos/não alérgicos e para os grupos ocupacionais.

O aumento de prevalência dos sintomas, sobretudo os cutâneos, são relacionados pelo pessoal hospitalar com o ambiente interior. Os resultados observados são semelhantes aos encontrados nos hospitais de outros países europeus. Particularmente a comparação com hospitais da Suécia, mostram claramente as diferenças climáticas existente entre aquele país e Portugal.

Palavras-chave: Clima interior, factores ambientais, qualidade do ar, cheiros desagradáveis, fumadores passivos, ruído, factores de fundo, síndrome de edifícios insalubres.

SUMMARY

A standardized questionnaire (MMO40 EA) developed at the Medical Center Hospital, Örebro, Sweden, used in many countries, especially in the Nordic Countries, was used to evaluate the indoor climate quality, as perceived by the occupants, the hospital personnel, in the University Teaching Hospital, Coimbra (HUC).

The questionnaire was sent to 15 Services, previously selected, of the Hospital, a monobloc building, nine years old. The questionnaire was also sent to the Maternity, another hospital building, about 30 years old. A total of 1298 people of the 15 Hospital services selected, 582 answered the questionnaire, which gives a response rate of 44,8%. In the Maternity, in a total of 180 people, 145 answered the questionnaire which gives a response rate of 80,6%.

The questionnaire covered questions about disturbing environment factors (temperature, air quality, unpleasant odour, passive smoking, noise and light), symptoms and their presumed relation to the hospital environment and background factors such as age, sex, occupation, smoking habits and history of allergy.

* Instituto de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina de Coimbra

** Dept. of Occupational and Environmental Medicine, Örebro Medical Center Hospital, Örebro, Suécia

*** Hospitais da Universidade de Coimbra

The hospital personnel was divided in four categories (doctors, nurses, administrative and services).

In the study carried out it was shown a higher prevalence for noise, non optimal temperatures and unpleasant odours. The prevalence for symptoms for men and women are similar, but women report much higher symptom prevalence than men.

It was found a significant difference in the prevalence between allergic persons and non-allergic persons, as well as between smokers and non-smokers. There are also clear differences in the perception of the indoor climate and symptoms among different occupational groups.

The increased symptom prevalence reported, specially skin symptoms, are related to the indoor environment by the personnel. The different outcome between various occupations are similar to what is seen in hospitals in other countries. Comparison with a hospital in Sweden show clearly the different climatic condition in Sweden compared to in Portugal.

Keywords: Indoor climate, environmental factors, air quality, unpleasant odour, passive smoking, noise, background factors, sick building syndrome.

Introdução

Nas últimas décadas vários estudos têm-se ocupado da elevada prevalência de problemas do clima interior dos edifícios e de sintomas que são designados como Síndrome dos Edifícios Doentes (Sick Building Syndrome – SBS) em edifícios não industriais. Um grupo de trabalho da OMS calculou que «up to 30% of new or remodelled buildings may have unusually high rates of complaints»¹. O problema da Qualidade do Ambiente Interior dos edifícios públicos (Indoor Environment Quality) tem vindo a preocupar a comunidade científica e as autoridades sanitárias nos últimos vinte anos^{2 a 21}. Em particular o clima interior dos hospitais tem sido objecto da atenção mais específica, quer nos seus aspectos gerais^{22 e 23} quer nos seus aspectos biomédicos e médicos^{24 a 54}.

Resultados diferentes são apresentados nos vários estudos, no entanto é evidente que muitas pessoas são afectadas por um clima interior desconfortável, nas suas casas, no local de trabalho, nas escolas e em outros locais públicos. Num inquérito a nível nacional feito na Suécia, cerca de meio milhão da população adulta (7-8%), queixou-se de sintomas os quais relacionavam com suas casas⁵⁵. Em particular, nos ocupantes de grandes edifícios de andares construídos depois de 1975, mas muito especialmente em mulheres ou pessoas com problemas alérgicos. Estudos efectuados em escritórios mostraram uma prevalência muito elevada de queixas e de sintomas os quais eram atribuídos pelos ocupantes ao clima interior dos escritórios. Este tipo de problemas foi também com frequência verificado em escolas ou em centros de acolhimento diários em países com um clima frio^{56,57 e 58}. Nos controlos de ventilação efectuados nos últimos anos na Suécia em escolas e em centros de acolhimento diários, mostravam que menos de 50% dos edifícios tinham condições satisfatórias de ventilação.

Nos edifícios onde existem queixas sobre o ar interior, é muitas vezes fácil encontrar uma explica-

ção quando o sistema de ventilação não funciona, existem avarias na canalização ou são encontrados bolores. Em geral, contudo as situações não são muito claras, pois além duma ventilação imperfeita, podem ocorrer emissões a partir dos materiais de construção ou por difusão microbiológica. A experiência tem mostrado que grandes vistorias técnicas com medições químicas ou microbiológicas numa fase inicial raramente dão resultados nos quais se possam basear medidas de comparação.

De igual modo o exame clínico dos ocupantes ou as amostras de sangue não dão qualquer indicação, principalmente porque não existem métodos para obter uma descrição objectiva e relevante dos efeitos sobre a saúde. Investigações sistemáticas, iniciando-se com exames técnicos simples e a obtenção de uma informação estruturada dos ocupantes, geralmente fornecem uma base para se efectuarem as necessárias medições técnicas complementares nos edifícios e para se seleccionarem eficientes medidas de recuperação. Esta estratégia foi apresentada num documento da OMS⁵⁹ e tem na prática sido seguido como o método de escolha nos países nórdicos.

A imagem da saúde e da doença têm sido modernamente caracterizadas numa perspectiva ecossistémica⁶⁰. Esta perspectiva de um ecossistema pode ajudar na descrição da complexidade biológica de um hospital e contribuir como método para analisar os problemas de saúde que são específicos do clima hospitalar^{61 e 62}. O conceito ecossistémico permite por um lado que os médicos, e o restante pessoal hospitalar, tenham uma visão mais alargada das suas responsabilidades ocupacionais. Por outro lado, o pessoal hospitalar na sua complexa actividade profissional está integrado num ecossistema fechado em que como ocupantes permanentes, estão sujeitos a graves riscos de saúde que agora começam a ser mais estudados⁶³.

Nos hospitais da Universidade de Coimbra (HUC) têm surgido nos últimos anos queixas sobre a qualidade do clima interior, ainda que a construção do hospital remonte só a 1987. Para avaliar a qualida-

de do clima interior dos HUC recorreu-se a um questionário piloto com a finalidade de se analisar a sensibilidade dos seus ocupantes normais, isto é o pessoal hospitalar, excluindo os doentes que são ocupantes temporários. Este artigo apresenta os resultados da análise do inquérito utilizado.

Os sintomas comunicados eram não específicos em carácter mas prevalentes no pessoal hospitalar. O conceito do Síndrome dos Edifícios Doentes (Sick Building Syndrome) é aqui usado para descrever aqueles sintomas gerais (fadiga e dores de cabeça), irritação das membranas mucosas dos olhos, nariz e garganta, além dos sintomas cutâneas. Edifícios doentes são geralmente definidos como edifícios «where people experience general symptoms – while working in, living in or otherwise occupying the building – more often than on other buildings»¹.

Material e métodos

A estratégia prática para investigar os Edifícios Doentes foi definida no relatório da OMS em 1983⁵⁹. A técnica usada foi de uma abordagem gradual e de uma avaliação de resultado antes de se tornar a decisão para o passo seguinte. Medidas mais sofisticadas e mais dispendiosas, só deveriam ser tomadas se fosse considerado necessário.

A estratégia básica atrás referida pode socorrer-se de uma metáfora, o «diagnóstico clínico». Um médico observando pela primeira vez um paciente desejará primeiramente diagnosticar a doença. Para o efeito o médico procurará reunir dados sobre o seu doente, como sinais e sintomas num exame físico, a sua tensão arterial, ritmo cardíaco, etc., tentando fazer o diagnóstico. Normalmente um médico não pode fazer o diagnóstico numa primeira visita, pelo que procurará completar os seus elementos, com análise de sangue, da urina, etc., antes de estabelecer um diagnóstico conclusivo. Nesta base o médico pode iniciar o tratamento, preventivo ou curativo, e continuar a observar os resultados com uma observação regular do doente, provavelmente com mais testes.

Existe obviamente um paralelismo na conduta a ter com os Edifícios Doentes. Antes do «tratamento» torna-se necessário estabelecer um «diagnóstico». Os meios disponíveis consistem na informação dada pelos ocupantes que trabalham no edifício, bem como as avaliações técnicas e as medições do clima interior. A abordagem tem de ser holística. Além dos factores físicos, químicos e biológicos, o ambiente psicossocial e as características individuais devem ser incluídas na avaliação.

Os métodos epidemiológicos são úteis em descrever as experiências e as percepções dos ocupantes sobre o clima interior dos edifícios ou para se avaliarem os resultados das medidas tomadas. Os pré-requisitos básicos são instrumentos válidos e seguros para se obterem informações sobre os ocupantes dos edifícios.

A informação deve ser obtida dos ocupantes, através de entrevista ou utilizando-se questionários estandardizados. Alguns tipos de questionários tem sido mais usados como o da «Royal Society of Healthy Advisory Group on Sick Building Syndrome»⁶³ concebido para edifícios de escritórios. No presente estudo foram utilizados os chamados questionários estandardizados MM⁶⁴, particularmente usados nos países nórdicos. A intenção original foi criar um questionário simples e curto, com duas páginas no máximo, com perguntas claras, válidas e fiáveis. Através do questionário são coligidos dados sobre os factores perturbadores do clima interior e dos sintomas experimentados no período dos últimos três meses.

O «Questionnaire Örebro» de que em anexo se inclui a versão portuguesa, cobre questões gerais sobre factores perturbadores do ambiente (temperatura, qualidade do ar, cheiros desagradáveis, fumadores passivos, ruído e luminosidade). Em relação aos sintomas e a sua presumível relação com o ambiente hospitalar eram referidos factores de fundo, como idade, sexo, ocupação, hábitos tabágicos e história de alergia.

As perguntas sobre sintomas e queixas tinham três categorias de resposta:

«Sim, com frequência (cada semana)», «Sim, por vezes», «Não, nunca».

Na prática, a primeira alternativa é definida como uma resposta positiva. Um estudo metodológico comparando diferentes escalas de frequência referida que «sim por vezes» neste contexto era equivalente e pelo menos 3-4 dias por semana⁶⁵. Cada pergunta de sintoma é seguida de uma outra inquirindo se o respondente atribuía o sintoma a um ambiente específico.

A representação dos resultados numa forma gráfica especial permite com rapidez e com simplicidade mostrar o tipo e a dimensão dos problemas e ao mesmo tempo facilitar um diagnóstico preliminar. As medições técnicas podem então ser tomadas com melhor conhecimento da situação. O «Questionário Örebro» é bastante estável com o tempo e pode ser usado para seguir os efeitos das medidas de recuperação que forem aconselhadas⁶⁶.

No presente estudo dos Hospitais da Universidade de Coimbra o preenchimento do questionário

foi feito com o auxílio do Serviço Social e fazendo apelo exclusivo à personalidade cívica de cada um dos inquiridos sem interferência de factores de influência, como os sindicatos, as comissões de saúde ou os serviços de administração hospitalar. Depois de preenchidos e codificados os questionários foram enviados para o Hospital de Örebro na Suécia, onde foram analisados pelo Programa do Questionário Estandarizado MM 040 EA.

Dos cerca de 40 Serviços e Laboratórios do Hospital foram seleccionados 15, com base na representatividade das áreas clínicas, das especialidades cirúrgicas, dos laboratórios de diagnóstico e dos serviços de apoio. Foram ainda determinantes as indicações dadas pelos Serviços Técnicos do Hospital, de acordo com a localização dos Serviços seleccionados no vasto edifício monobloco de 14 andares. De referir que ao inquérito foi imposto o período de 3 semanas. Um dos Serviços seleccionados excedeu aquele período e foi excluído. Num outro Serviço os enfermeiros recusaram colaborar alegando motivos políticos.

Para análise dos resultados foi usado o teste χ^2 da diferença na prevalência entre os diferentes subgrupos. Dois testes diferenciados («tailed tests») e um nível de significância de 5% foi utilizado.

Num total de 1298 pessoas dos Serviços seleccionados no Hospital responderam 582 o que dá uma resposta de 44,8%. Na Maternidade, um edifício com cerca de 30 anos e escolhido como comparação, de um total de 180 pessoas, responderam ao questionário 145, o que dá uma taxa de 80,6% de respostas.

Resultados

Os resultados do questionário para o Hospital mostram-se no Gráfico 1, comparados com os resultados da Maternidade. As prevalências para o ruído, para temperaturas não óptimas, e para cheiros desagradáveis, são relativamente elevadas e muito mais elevadas que os valores de referência. Os valores de referência que se encontram no centro dos gráficos baseiam-se em estudos efectuados na Suécia em edifícios não-industriais e em escolas consideradas «saudáveis», isto é sem problemas de clima interior. Estes valores de referência são usados nos estudos de edifícios não-industriais nos países nórdicos^{67 e 68}.

Em geral verifica-se um aumento de prevalência dos sintomas, especialmente os sintomas cutâneos, que são relacionados pelo pessoal hospitalar com o ambiente interior. Os resultados para a Maternidade

mostram um padrão semelhante quer para os factores ambientais quer para os sintomas. No entanto na Maternidade os sintomas são menos expressivos.

O padrão de queixas para os homens e para as mulheres (Gráfico 2) são semelhantes, com as mulheres a apresentarem uma prevalência mais elevada dos sintomas que os homens ($p < 0.05$).

As pessoas alérgicas apresentam uma prevalência muito mais elevada de irritação das membranas mucosas e de sintomas cutâneos (Gráfico 3) que os indivíduos não-alérgicos ($p < 0.05$). Por sua vez os fumadores como seria natural, apresentam mais queixas sobre o fumo do tabaco (Gráfico 4), mas em contrapartida apresentam menos queixas sobre os cheiros desagradáveis e sobre o ar seco que os fumadores, não sendo significativa a diferença. O padrão dos sintomas é quase idêntico para os fumadores.

Entre os diferentes grupos ocupacionais, médicos, enfermeiros e administrativos, existem claras diferenças na percepção do clima interior do hospital (Gráfico 5). Todos os grupos se queixam de ruído e de cheiros desagradáveis. Para o pessoal administrativo é mais elevada a frequência de queixas sobre o ar seco, das correntes de ar e das temperaturas elevadas. No que respeita ainda ao pessoal administrativo são maiores as queixas de irritação das membranas mucosas a qual relacionam com o clima interior ocupacional. A prevalência de sintomas gerais e da pele facial é também mais elevada neste grupo ocupacional, não sendo contudo estatisticamente significativo.

Os médicos têm prevalências mais baixas de sintoma que os outros grupos, os quais relacionam com o clima interior ($p < 0.05$). As enfermeiras apresentam em geral uma elevada prevalência de sintomas, especialmente as mãos secas, o que é uma ocorrência típica neste grupo ocupacional. Todos os grupos se queixam do fumo do tabaco com excepção dos serviços.

A percentagem das respostas positivas respeitantes aos 15 Serviços e Laboratórios envolvidos no inquérito ao hospital são apresentados no Quadro I, igualmente com as percentagens dos respondentes. No Quadro II são apresentadas igualmente as percentagens das respostas positivas para os quatro grupos ocupacionais, médicos, enfermeiros, administrativos e serviços.

Verifica-se uma grande diferença de queixas e de sintomas, o que reflecte a grande heterogeneidade do ambiente específico próprio da actividade de cada departamento. Como exemplo ilustrativo mostram-se os casos extremos, o do laboratório de Anatomia Patológica (Gráfico VI) e o do Serviço de

Farmácia (Gráfico VII). No primeiro caso 70 por cento do pessoal queixa-se de sintomas do nariz e dos olhos e que relacionam com as condições de trabalho. Neste caso é óbvio uma exposição a líquidos voláteis irritantes como é o formaldeído ou o xilol, factores importantes do ambiente interno.

O ruído é um factor importante de perturbação na maioria dos Serviços. As queixas do fumo do tabaco, fumadores passivos, são surpreendentemente elevadas. Em muitos Serviços as queixas sobre correntes de ar e de temperaturas elevadas são prevalentes, o que pode estar relacionada com o mau funcionamento do sistema de ar condicionado.

No Quadro II são ainda apresentados os resultados globais para o Hospital e para a Maternidade. Na comparação entre as respostas do Hospital com a Maternidade verifica-se um nível muito significativo ($p < 0.01$) para as temperaturas baixas, cheiros desagradáveis e ruído. A um nível menos significativo ($p < 0.05$) verificam-se as queixas para as correntes de ar, sujidade e outras queixas. Para a Maternidade são muito significativas ($p < 0.01$) as queixas referentes a temperaturas elevadas.

Discussão e conclusões

Uma das ilações a retirar na variação das percentagens das respostas do pessoal hospitalar foi já a dificuldade da amostragem:

- a) A grande heterogeneidade de actividades ocupacionais dos diferentes serviços confinadas as áreas específicas na complexa estrutura do edifício monobloco hospitalar. A este importante aspecto teve ocasião de se referir Otávio Lopes num estudo apresentado em 1989⁶⁹, estudo que veio a desenvolver numa tese de doutoramento⁷⁰. Naquele estudo o hospital era considerado como uma instalação constituída por unidades de produção independentes na produção de bens e de serviços, com múltiplas relações de complexidade entre si. Esta complexidade de problemas da actividade hospitalar foi objecto de estudo de um grupo de trabalho do Ministério da Saúde, nos anos de 1990/94⁷¹.
- b) A dificuldade de estabelecer uma melhor amostragem devem-se em primeiro lugar ao período de 3 semanas imposto para o inquérito. Depois houve que enfrentar a natureza da actividade de cada serviço. É por exemplo muito diferente a dinâmica do Bloco Operatório quando comparada com a rotina modera-

da de uma enfermaria de medicina. Houve que contar com a rotação própria da prestação de cuidados médicos e com os turnos de pessoal que variam muito de serviço para serviço.

- c) Devido às taxas de resposta relativamente baixas e à falta de informação sobre a distribuição de ausência em relação ao sexo e ocupação, uma análise estatística mais detalhada não teria significado. O «Örebro Questionnaire» tem aliás a finalidade de uma análise sumária sobre situações concretas de problemas do clima interior dos hospitais, ou de estabelecimentos de cuidados de saúde, um tipo de informação necessária para que a administração de um hospital tome as necessárias medidas correctivas.

Como foi referido anteriormente a metáfora do «diagnóstico clínico dos Edifícios Doentes» é de extrema utilidade, uma primeira fase de estudo, precedendo outros métodos que descrevem objectivamente os efeitos sobre a saúde do pessoal hospitalar pelo clima interior dos edifícios. Novas técnicas e novos testes médicos têm sido descritos^{72 e 73}, inclusivamente já abordado nas páginas deste jornal⁷⁴.

A importância dos questionários MM, de que o «Questionário Örebro» é uma adaptação aos estudos do clima interior dos hospitais, está desenvolvida num trabalho de K. Andersson⁷⁵. Deve salientar-se que o «Questionário Örebro», fora dos países nórdicos, foi pela primeira vez utilizado na Europa, nos Hospitais da Universidade de Coimbra. As conclusões deste estudo foram igualmente analisados numa reunião internacional que teve lugar em Coimbra em 1995²⁴.

As prevalências das queixas e de sintomas são elevadas no Hospital mas do mesmo nível na Maternidade, um edifício cerca de 20 anos mais velho. As principais queixas têm a ver com o ruído, alterações de temperatura e cheiros desagradáveis. A exposição aos vários factores verifica-se ser bastante diferente nos vários sectores do hospital, sendo o ruído o factor geral de perturbação mais citada pelos ocupantes. A prevalência dos sintomas é bastante elevada mas semelhantes tanto no Hospital como na Maternidade. É curioso verificar que na Maternidade os sintomas são menos expressivos, talvez por ser um edifício mais pequeno e portanto mais controlável.

A diferença dos resultados entre os vários ocupantes do Hospital é semelhante à que é verificada nos hospitais de outros países europeus⁷⁶. A comparação com um hospital na Suécia mostra clara-

mente as diferenças climáticas as condições existentes na Suécia, comparadas com Portugal (Gráfico VIII). Na Suécia, especialmente no Inverno, o ar interior é extremamente seco porque o equipamento de humificação é raramente instalado. O uso de ar condicionado em Portugal pode explicar a prevalência extremamente elevada de queixas sobre ruído, correntes de ar, e variação de temperatura.

Apesar das grandes diferenças do clima interior nos hospitais da Suécia e em Portugal é interessante verificar-se que os padrões de sintomas são muito semelhantes em ambos os países⁷⁶. Os resultados do Inquérito Örebro nos Hospitais da Universidade de Coimbra confirmaram observações verificadas nos hospitais da Suécia, como seja o comportamento Homem/Mulher, dos Fumadores/Não Fumadores, dos Alérgicos/Não Alérgicos e inclusivamente o comportamento de três categorias profissionais. Os médicos em geral apresentam menos queixas e sintomas relacionados com o clima interior, enquanto os enfermeiros e os administrativos apresentam mais queixas relacionadas com o ambiente de trabalho. Os motivos para estas grandes diferenças entre as várias actividades ocupacionais poderiam ser explicados devido à natureza do trabalho envolvido. É conhecido que 79% dos médicos revelam um elevado estímulo pelo trabalho em comparação com menos de 56% dos outros grupos⁶⁵.

A perigosidade e os riscos ocupacionais num ambiente hospitalar foram comparados aos elevados riscos em ambientes industriais por C.C. Harling, Presidente da Faculty of Occupational Medicine, do Royal College of Physicians de Londres⁷⁷. Por sua vez Francis Roe em 1990²⁹ chamou vivamente a atenção para os problemas médicos do clima interior dos hospitais e da necessidade de um estudo epidemiológico mais orientado para a análise dos aspectos patológicos. F. Cruzet⁷⁸ salientou igualmente a necessidade dum estudo epidemiológico especificamente orientado para o ambiente interior hospitalar com base numa permanente análise clínica.

Em Portugal a perigosidade e os riscos do ambiente interior hospitalar não têm tido a devida atenção apesar das graves ocorrências verificadas em muitos hospitais, em especial com os verificados com anestesistas e instrumentistas nos blocos operatórios, aquelas que se conhecem.

Os resultados desta análise têm de ser interpretados com cuidado. A baixa taxa de respostas torna impossível uma análise avançada. Contudo, a experiência verificada em cada um dos diferentes serviços deve ser analisada com cuidado. É possível no

futuro aumentar as taxas de respostas e melhorar a base para que sejam tomadas medidas de correcção. Para que seja possível, torna-se necessário uma iniciativa de esclarecimento que melhore a percepção entre os ocupantes do hospital, que é o pessoal hospitalar, sobre as possibilidades de se efectuarem alterações no ambiente de trabalho.

Bibliografia

1. WHO, World Health Organisation. (1986) «Indoor Air Quality Research», Copenhagen, WHO Regional Office of Europe (EURO Reports and Studies, N.º 103, 1986).
2. **Fundamentals of Air Pollution**, 1973 eds. A.C. Stern, H.C. Wohters, R.W. Bonbel and W.P. Lowry, Academic Press, New York.
3. **Molecular Basis of Environmental Toxicity**, 1980, ed. R.S. Bhatnagar, Ann Arbor Science, Michigan, USA.
4. **Air Pollution Modeling and its Application, V**, NATO/CCMS 1986, eds., C. de Wispelaere, F.A. Schiermeier and N.V. Cillani, Plenum Press, New York.
5. **Environmental Toxicology – Organic Pollutants**, 1988, eds. J.K. Fawell and S. Hunt, Ellis Horwood, Chichester, England.
6. **Envirotech Vienna 1989. Chemicals, Technologies, Hazardous Waste**. International Society for Environment Protection, Vienna/Hofburg, Austria.
7. **The Implications of Indoor Air Quality for Modern Society** 1989, NATO/CCMS Pilot Study on Indoor Air Quality – Erice, Italy.
8. **Managing Indoor Air Quality Risks** 1989, NATO/CCMS Pilot Study on Indoor Air Quality – St. Michaels, Maryland, USA.
9. **Indoor Air Quality and Ventilation**, 1990, eds. F. Lunau and G.L. Reynolds, Selver Lt. London, England.
10. **National Environmental Outlook2, 1990-2000** National Institute of Public Health and Environmental Protection (RIVM), 1992, Bilthoven, Holand.
11. **Energy of Building Science in Indoor Air Quality** 1990 NATO/CCMS Pilot Study on Indoor Air Quality, Sainte-Adèle, Québec, Canada.
12. **Pollution de L'Air a L'Intérieur des Locaux**, 1991, Indoor Air International/APPA, Paris.
13. **Epidemiology and Medical Treatment of Building – Related Complaints and Diseases**, 1991, NATO/CCMS Pilot Study in Indoor Air Quality, Oslo, Norway.
14. **Methods of Risk Assessment**, 1991, NATO/CCMS Pilot Study in Indoor Air Quality – Kloster Banz, Austria.
15. **Indoor Air Pollution – Problems and Priorities**, 1992, eds. G.B. Leslie and F.W. Lunau, Cambridge Univ. Press, Cambridge, Great Britain.
16. **Indoor Air Pollution. Problems and Priorities**, 1992, ed. G.B. Leslie and F.W. Lunau, Cambridge University Press, England.
17. **Sampling and Analysis of Biocontaminants and Organic in Non-Industrial Indoor Environment**, 1992, NATO/CCMS Pilot Study on Indoor Air Quality, Chapel Hill, North Carolina, USA.
18. **I International Workshop on Indoor Radon Remedial Action**, 1993, ENEA/DISP, Roma, Italy.
19. **Volatile Organic Compounds in the Environment**, 1995. Second International Conference, ed. J.J. Knight and R. Perry, Indoor Air International Unit. 179, Old Brompton Road, London SW7 3DQ, UK.
20. **Healthy Buildings 95, An International Conference on Healthy Buildings in mild Climate**, 1995, NATO, Advanced Research Workshop, Milan, Italy.
21. «**Moisture and Cold Climate Solutions**», 1995 Indoor Air Quality in Practice Int. Symposium Oslo, Norway.
22. **Ecological Summit 96**, 1996, The Royal Danish School of Pharmacy Copenhagen, Denmark.

23. **Final Meeting of the Pilot Study on Indoor Air Quality**, 1996, NATO/CCMS Pilot Study on Indoor Air Quality Erice (Sicily), Italy.
24. **International Conference on the Hospital Environment**, 1995, The University Teaching Hospital (HUC), Coimbra, Portugal.
25. **Ventilation and Indoor Air Quality Requirements in Hospitals**, 1995 NATO/CCMS Pilot Study on Indoor Air Quality, Milan, Italy.
26. **International Utility Symposium, Health Effects of Electric and Magnetic Fields, Research, Communications, Regulation**, 1986, Ontario, Hydro, Toronto, Canada.
27. **Occupational and Environmental Chemical Hazards – Cellular and Biochemical Indices for Monitoring Toxicity**, 1987, eds., V. Foá, E.A. Emmett, M. Masoni and A. Colombi, Ellis Horwood, Chichester, England.
28. **Indoor Air, respiratory health and pulmonary function in children. A critical review**, 1990, Sheddou, J.M. and Bearpark, T.M., in «Indoor Air Quality and Ventilation», ed. F. Lunau and G.L. Reynolds, Selper Ltd, London.
29. **Medical aspects of indoor air quality**, 1990, Roe, F.J.C. in *Ibidum*.
30. **Indoor air pollution and non-respirations disease**, 1990, Skrabanek, P., in *Ibidum*.
31. **Environmental tobacco smoke (ETS) and cardiovascular disease** 1990, Weetman, D.F. and Munby, J. in *Ibidum*.
32. **Methods of containment to reduce exposure to animal allergens and chemical hazards in research buildings**, 1990, «in *Ibidum*».
33. **Environmental Toxicants – Human Exposures and Their Health Effects**, 1992, d. by Morton Lippmann, Van Nostrand Reinhold, New York.
34. **Asthma Symptoms in relation to volatile organic compounds (VOC) and bacteria in dwellings**, 1993, Norback, D. et al in «Volatile Organic Compounds in the Environment», Indoor Air International (IAI), Rothenfluh, Switzerland.
35. **Volatile organic compounds and bladder cancer** G. Crépat, 1993, in *Ibidum*.
36. **Czech and Slovak experience with exposure to formaldehyde in indoor air**. V. Bencko & I. Holcátová, 1993, in *Ibidum*.
37. **Limits and dose-response effect of formaldehyde on health status** I. Holcátová, 1993, in *Ibidum*.
38. **Emission of volatile organic compounds (VOC) from water-based paints – a contributing cause respiratory symptoms and bronchial hyperresponsiveness?** G. Weislander et al, 1993, in *Ibidum*.
39. **Review of occupational and environmental exposures to organics and associations with leukaemia and preleukaemia**, D.A. Staford, et al, 1993, in *Ibidum*.
40. **Overview of the current issues relating to the health and toxic effects of benzene**, 1993, A. Yardley-Jones, in *Ibidum*.
41. **Levels of volatile organic compounds in a non-occupationally exposed US population**, L.L. Needham, 1993, in *Ibidum*.
42. **Does environmental benzene exposure cause childhood leukaemia?** 1993, S. Wolff, in *Ibidum*.
43. **Environmental VOC's – The hazard and the Risk** Hoskins, J.A., 1993, in *Ibidum*.
44. **Air Concentration of Total Volatile Organic Compounds (TVOC) and Carbon Dioxide (CO₂) and Sick Building Syndrome (SBS) – Symptoms among the Staff in Schols and Kindergartens**, S. Willers, et al, 1993, in *Ibidum*.
45. **Sick Building Syndrome (SBS) and the Home Environment the Role of Inflammatory Reactions and Exposure to Volatile Organic Compounds**. D. Norb'ok, et al, 1993, in *Ibidum*.
46. **Indoor Air Quality and Respiratory Disease**, 1994, Proceedings of a Seminar, Dijon, France, eds. R. Fritsch, G.B. Leslie and K. Leslie, Indoor Air International, Rotanfluh, Switzerland.
47. **International Symposium on Human Health and Environment – Mechanisms of Toxicity and Biomarkers to Assess Adverse Effects of Chemicals**, Proceeding of the Int. Symp. on Human Health and Environment, 1994, Salsomaggiore Terme (Parma), Italy, eds. A. Mutti, P.L. Chambers and C.M. Chambers, Elsevier, Amsterdam.
48. **Biochemical Biomarkers in Environmental Toxicology**, 1994, Churchill College, University of Cambridge, England.
49. **IV International Conference WWWDU 94 (Work with Display Units)**, 1994, Milan Italy.
50. **II International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations 1995**, The Prague Institute of Advanced Studies, Prague, Czech Republic.
51. **III Annual HERSL Symposium on Susceptibility and Risk**, 1995, US EPA, National Health and Environment, Effects, Research Laboratory Research Triangle Park, NC27N, USA.
52. **Clinical Recognition of Health Hazards in the Home**, 1995, Northwest Center for Occupational Health and Safety, University of Washington, USA.
53. **The II IFCC/Arnold O. Beckman European Conference on Biomarkers in Environmental Toxicology**, 1995, Cannes, France.
54. **International Symposium on Biological Monitoring in Occupational and Environmental Health**, 1996, Espoo, Finland.
55. **«The indoor climate in the Swedish housing stock»**, Norlén U, Andersson K. (eds.) Stockholm, *Swedish Council for Building Research D10*: 1993.
56. **«The sick building syndrome in the office environment: The Danish town hall study»**, Skov P, Valbjørn O. and the Danish Indoor Climate Study Group (DISG), (1987) *Environent International*, **13**, 339-349.
57. **«The office illness project in northern Sweden. Part 1: A prevalence study of sick building syndrome (SBS) related to demographic data, work characteristics and building factors»**, Stenberg B, Hansson Mild K, Sandstrom M, Lönnberg G, Wall S, Sundell J. Zingmark P.A. (1990) *In Proceedings of the 5th International Conference*, Vol. 4, 627-632, Ottawa.
58. **«Health and indoor climate complaints of 7043 office workers in 61 buildings in the Netherlands»** Zweers, T, Preller L, Brunekreef B, Boleij J.S.M. (1992) *Indoor Air*, **2**, 127-136.
59. **WHO, World Health Organisation**. (1983), «Indoor Air Pollutants. Exposure and Health Effects» Copenhagen, *WHO Regional office of Europe (EURO Reports and Studies, N.º 78)*.
60. **The Marriage of Ecology and Medicine: Are they Compatible? 1995 – David Ehrenfeld**. Ecosystem Health, Vol. **1**: 15-22.
61. **The Hospital as Ecosystem 1995 – Joseph J. Fins**, Ecosystem Health, Vol. **2**: 255-259.
62. **Human and Ecosystem Health: Management Despite Some Incompatibility (1995) – M.M. Gordon Wolman**, Ecosystem Health, Vol. **1**: 35-40.
63. **«A questionnaire for studies of sick building syndrome: A report to the Royal Society of Health Advisory Group on sick building syndrome»**, Raw G.J., ed. (1995) *Building Research Establishment Report*, Watford.
64. **The MM-questionnaires – a tool when solving indoor climate problems**. Andersson, K, Stridh G, Fagerlund I, Larsson B. Department of Occupational and Environmental Medicine, Örebro, Sweden, 1993, ISBN 91-971641-2-7.
65. **«Questionnaire design for sick building syndrome. Part II: The effect of symptom list and frequency scale»**, Raw G, Roys M, Tong David (1994) *In Proceedings of Healthy Buildings'94*, Vol. **1**, 481-486, Budapest.
66. **«The use of standardized questionnaires in building related illness (BRI) and sick building syndrome (SBS) surveys»**, Andersson K, Stridh G. (1992) in Levy F, Maroni M (eds), NATO/CCMS pilot study on Indoor Air Quality, 4th plenary meeting, Oslo, *National Institute of Occupational Health*, 47-64.
67. **«Indoor Climate of a Swiss Building evaluated with adapted Swedish Questionnaires»**, Schultz U.W, Andersson K, Stridh G. (1990) *In proceedings of the 5th International Conference*, Vol. **1**, 651-655, Ottawa.
68. **«Carbon Dioxide, Particulates, and Subjective Human Responses in Office Buildings Without Histories of Indoor Air Quality Problems»**, Hill B. Craft B.F., Burkat J.A. (1992) *Applied Occupational and Environmental Hygiene*, **7**, 101-111.
69. **Contribuição para uma Nova Conceção de Definição e de Organização dos Espaços da Instituição Hospitalar – Octávio G. Lopes – I Congresso de Instalações e Equipamentos de Saú-**

- de de Portugal e dos Países Africanos de Língua Oficial Portuguesa, 1989, Lisboa.
70. **Planification Regionale des Installations D'Imagerie Medicale Classique et Nouvelle Dans la region Centre du Portugal** – Octávio G. Lopes – Tese para o grau de Doutor em Saúde Pública, apresentado à Universidade Católica de Lovaina, 1994 Bruxelas.
 71. **O Núcleo de Estudos Ambientais do Ministério da Saúde. Quatro anos de actividade** – J.J. Amaral Mendes, Arquivos do Instituto Nacional de Saúde, Vol. XVI-XVII, 1991/92, Lisboa.
 72. «**Influence of personal characteristics, job-related factors and psychosocial factors on the sick building syndrome**», Skov P, Valbjörn, O, Pedersen B.V. and the Danish Indoor Climate Study Group (DISG), (1989) *Scandinavian Journal of Work, Environmental and Health*, **15**, 286-295.
 73. «**Prevalence of objective eye manifestations in people working in office buildings with different prevalences of the sick building syndrome compared with the general population**», Franck C, Bach E, Skov P, (1993) *International Archives of Occupational and Environmental Health*, **65**, 65-69.
 74. **Sindroma dos Edifícios Insalubres (Sick Building Syndrome)** – Amaral J.J. Mendes, Arquivo do Instituto Nacional de Saúde, 16-17, 1991-92.
 75. **Epidemiological Approach to Indoor Air Problems** – Kjell Andersson, Örebro Medical Center Hospital, S-701 85 Örebro, Sweden.
 76. **Indoor Air Problems in Hospitals** – Kjell Andersson, International Conference on the Hospital Environment, The University Teaching Hospital, 1995, Coimbra, Portugal.
 77. **Occupational Health and Safety in Hospitals** – C.C: Harling. In ibidum.
 78. **Medicina Ocupacional en Hospitales** – F. Cruzet, Servicio de Medicina Preventiva, Hospital Clínico de S. Carlos, Universidad Complutense, 1995, Madrid.

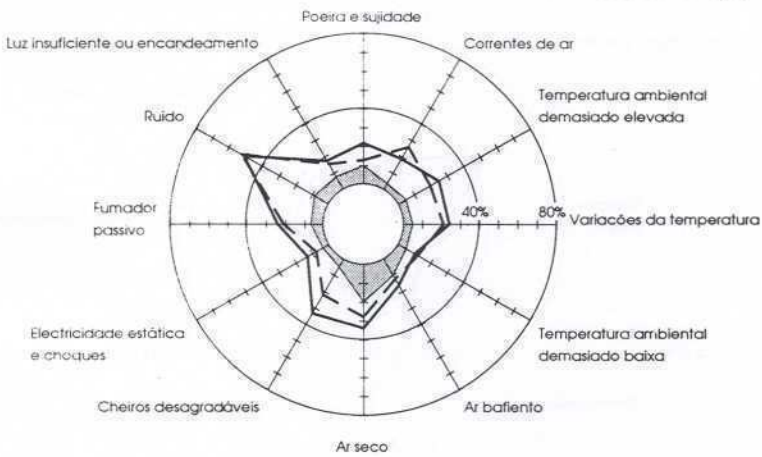
GRÁFICO I
HOSPITAL/MATERNIDADE

CLIMA INTERIOR Ambiente de Trabalho MM 040 EA

Inst de Anatomia Patológica
Coimbra, 1995
Estudo I - Alergico / Não-Alergico

AMBIENTE DE TRABALHO
(Incomodado com frequencia) %

Reference data after Report M5/90.
Dept of Occup and Environm Med.
Örebro Medical Centre Hospital.



SINTOMAS
(Sim, com frequencia) %

Alergico (n=168) ———
Não-AI (n=353) - - - -



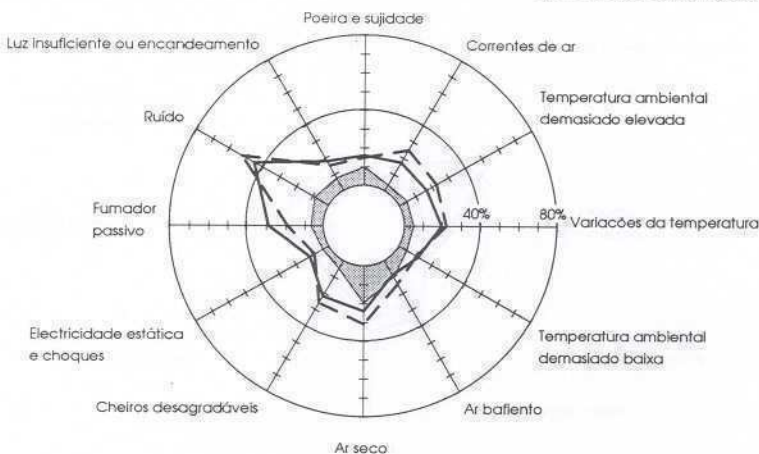
GRÁFICO II
HOMEM/MULHER

CLIMA INTERIOR Ambiente de Trabalho MM 040 EA

Inst de Anatomia Patológica
Coimbra, 1995
Estudo I - Homem / Mulher

AMBIENTE DE TRABALHO
(Incomodado com frequencia) %

Reference data after Report M5/90.
Dept of Occup and Environm Med.
Örebro Medical Centre Hospital.



SINTOMAS
(Sim, com frequencia) %

Homem (n = 137) ———
Mulher (n = 394) - - - -



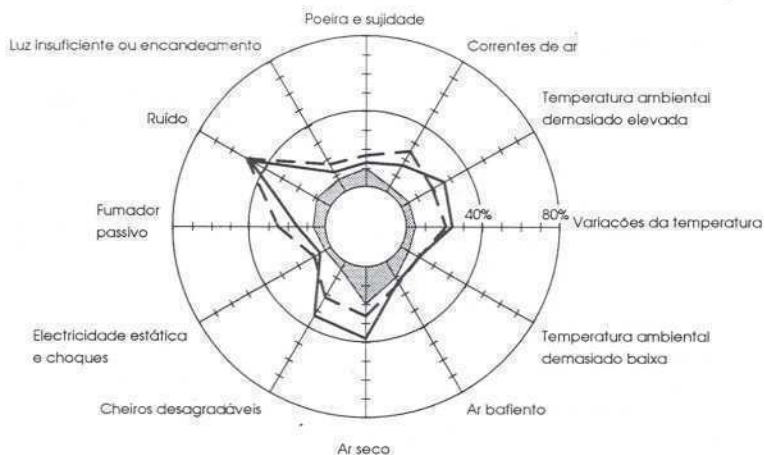
GRÁFICO III
FUMADOR/NÃO FUMADOR

CLIMA INTERIOR Ambiente de Trabalho MM 040 EA

Inst de Anatomia Patológica
Coimbra, 1995
Estudo I - Fumador / Não fumador

AMBIENTE DE TRABALHO
(Incomodado com frequência) %

Reference data after Report M5/90
Dept of Occup and Environm Med
Örebro Medical Centre Hospital.



SINTOMAS
(Sim, com frequência) %

Fumador (n=144) —
Não fum (n=367) - - -



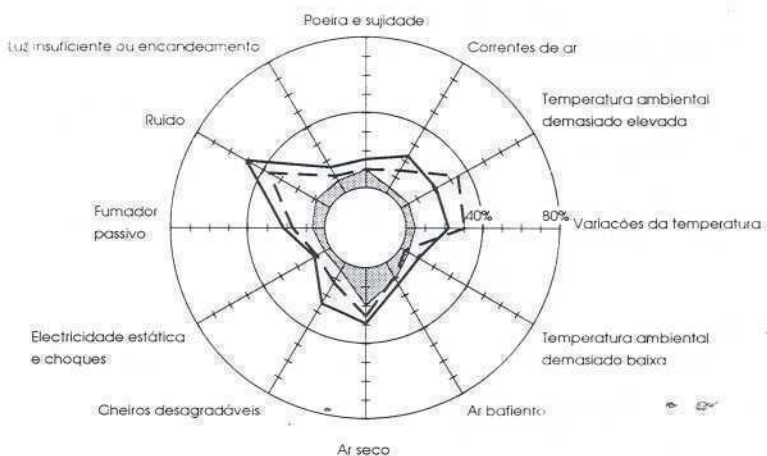
GRÁFICO IV
ALÉRGICO/NÃO ALÉRGICO

CLIMA INTERIOR Ambiente de Trabalho MM 040 EA

Inst de Anatomia Patológica
Coimbra, 1995
Estudo I / Maternidade

AMBIENTE DE TRABALHO
(Incomodado com frequencia) %

Reference data after Report Ms. 90
Dept of Occup and Environm Med
Örebro Medical Centre Hospital



SINTOMAS
(Sim, com frequencia) %

Estudo I (n=536) ———
Matern (n=145) - - -



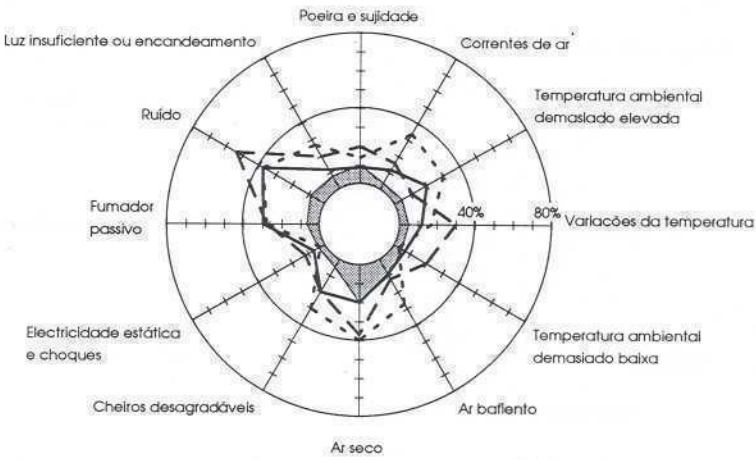
GRÁFICO V
AS 3 CATEGORIAS OCUPACIONAIS

CLIMA INTERIOR Ambiente de Trabalho MM 040 EA

Inst de Anatomia Patológica
Coimbra, 1995
Médico Enfermeira, Administrativo

AMBIENTE DE TRABALHO
(Incomodado com frequência) %

Reference data after Report M5/90,
Dept of Occup and Environm Med,
Örebro Medical Centre Hospital.



SINTOMAS
(Sim, com frequência) %

Médico (n=96) ———
Enfermeira (n=131) - - - -
Adm (n = 60)



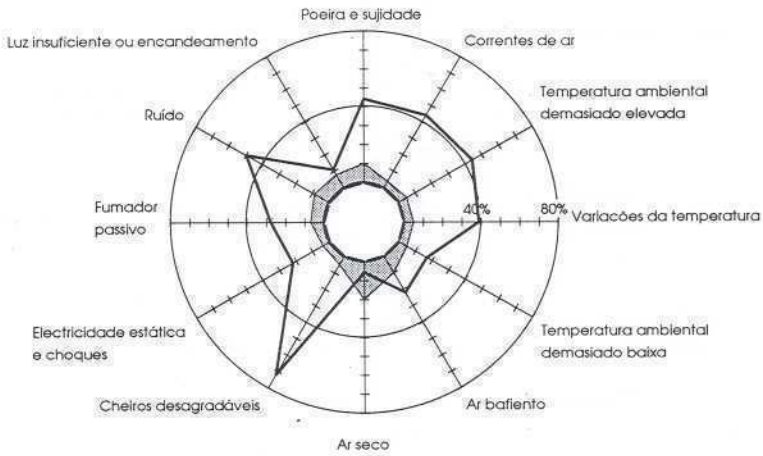
GRÁFICO VI
ANATOMIA PATOLÓGICA

CLIMA INTERIOR Ambiente de Trabalho MM 040 EA

Inst de Anatomia Patológica
Coimbra, 1995
Lab. Anatomia Patológica

AMBIENTE DE TRABALHO
(Incomodado com frequencia) %

Reference data after Report M5/90.
Dept of Occup and Environm Med,
Örebro Medical Centre Hospital.



SINTOMAS
(Sim, com frequencia) %

Lab Anat (n=18) ———
Devidos ao amb - - - -

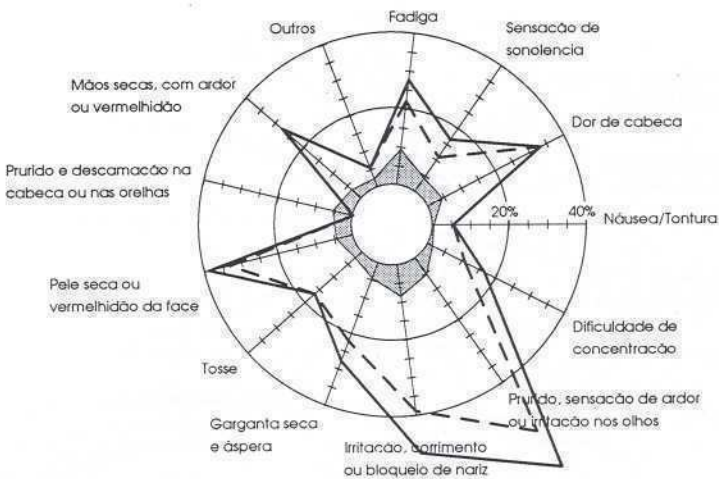


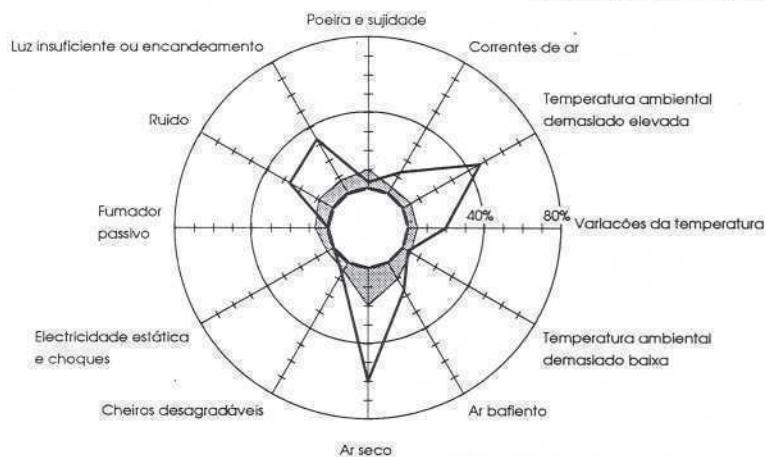
GRÁFICO VII
FARMÁCIA

CLIMA INTERIOR Ambiente de Trabalho MM 040 EA

Inst de Anatomia Patológica
Colmbia, 1995
Farmácia

AMBIENTE DE TRABALHO
(Incomodado com frequencia) %

Reference data after Report M5/90,
Dept of Occup and Environm Med,
Örebro Medical Centre Hospital.



SINTOMAS
(Sim, com frequencia) %

Farmácia (n=30) ———
Devidos ao amb - - - -

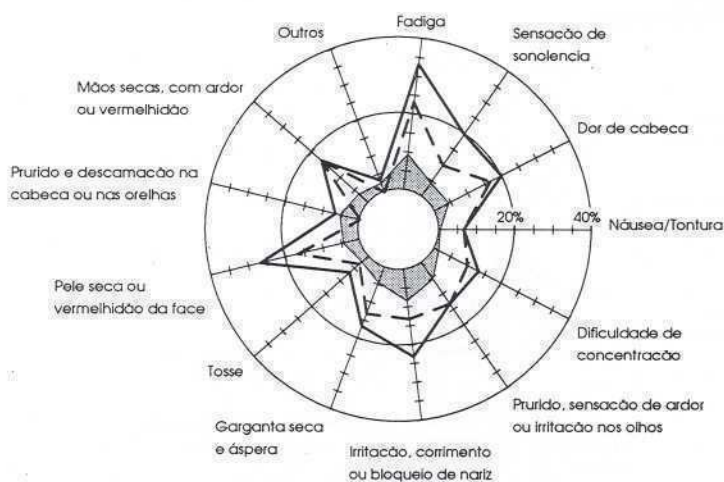


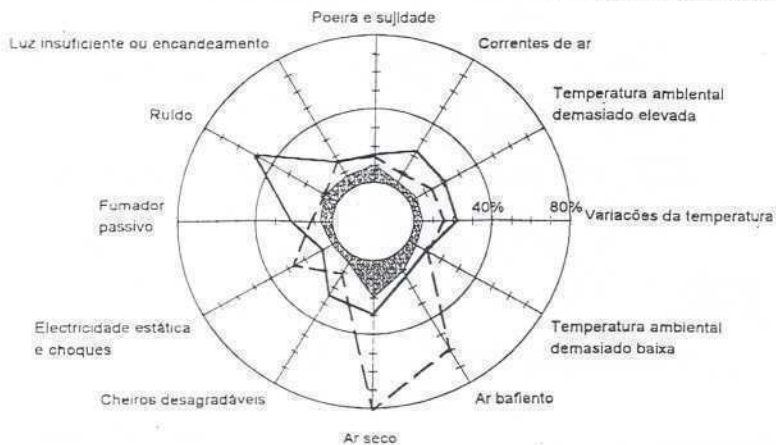
GRÁFICO VIII
HUC/HOSPITAL ÖREBRO

CLIMA INTERIOR Ambiente de Trabalho MM 040 EA

Coimbra e Estocolmo

AMBIENTE DE TRABALHO
(Incomodado com frequência) %

Reference data after Report M5/90,
Dept of Occup and Environm Med,
Örebro Medical Centre Hospital.



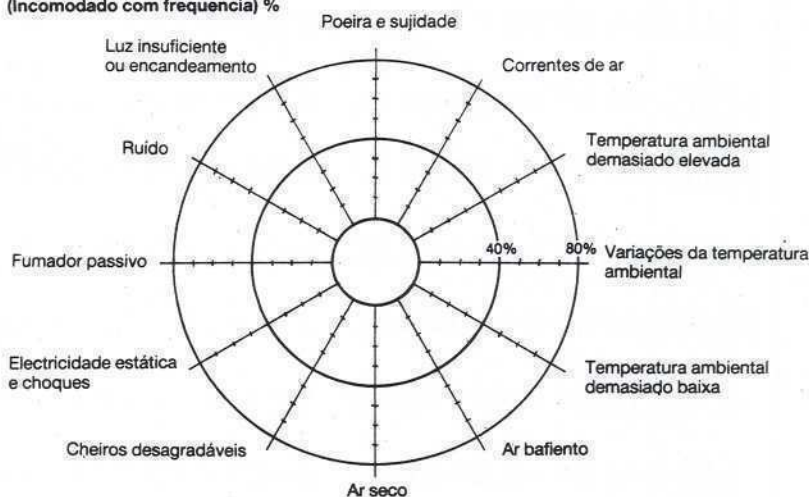
SINTOMAS
(Sim, com frequência) %

Coimbra (n=536) —
Estocolmo (n=723) - - -



FOLHA DE TRABALHO

CLIMA INTERIOR Ambiente de Trabalho MM 040 EA

AMBIENTE DE TRABALHO
 (Incomodado com frequência) %

SINTOMAS
 (Sim, com frequência) %

 Environment med, Dept. Occ. Med,
 Örebro, test version 8812/K Andersson

Andersson K and Stridh G. The use of Standardized questionnaires in building-related illness (BRI) and sick building syndrome (SBS) surveys. NATO/CCMS Pilot Study on Indoor Air Quality, eds. F. Levy and M Maroni, National Institute of Occupational Health, Oslo, Norway, 1992.

Tradutor: J.J. Amaral-Mendes

QUADRO I

RESULTADOS RESPEITANTES AOS 15 SERVIÇOS E LABORATÓRIOS EM PORCENTAGEM DE RESPOSTAS POSITIVAS EM RELAÇÃO AO AMBIENTE DE TRABALHO E AOS SINTOMAS ACTUAIS

	Bloco opera- tório	Gineco- logia	Neuro- cirurgia	Urgên- cias	Infecto- Conta- giosas	Imagio- logia	UCIP	Lab. Anatom. Pat.	Lab. Pat. Clin.	Imuno- hemote- rápia	Lab. Hema- tologia	Farma- cia	Alimen- tação	Esteri- lização	Pneu- mologia
	40/100 (40)	58/90 (64.4)	15/55 (27.3)	41/123 (33.3)	16/40 (40)	75/150 (50)	31/52 (59.6)	18/37 (48.6)	42/93 (45.2)	38/57 (66.7)	21/36 (58.3)	30/59 (50.8)	78/256 (30.5)	33/50 (66)	46/100 (46)
Correntes de ar	33	3	7	46	19	1	—	44	19	21	19	13	63	15	11
Temperaturas elevadas	13	16	33	22	50	15	29	44	31	18	19	47	15	3	17
Variações de temperatura	45	21	20	15	13	13	29	39	21	29	19	20	22	15	13
Temperaturas baixas	40	7	—	7	—	7	10	17	14	13	—	3	13	9	4
Ar bafiento	8	5	13	15	19	7	13	22	26	32	24	17	8	6	26
Ar seco	33	24	40	44	50	27	52	6	41	37	38	60	3	6	28
Cheiros desagradáveis	10	7	7	22	38	15	45	72	69	26	48	7	22	12	39
Electricidade estática	13	16	—	17	—	5	7	22	5	16	24	—	3	18	4
Fumador passivo	38	17	60	42	44	19	19	28	31	26	24	—	7	6	48
Ruído	50	48	40	42	38	21	58	50	74	55	19	27	80	79	35
Problemas de luminosidade	33	16	20	27	25	7	10	11	14	18	10	33	14	6	28
Poeira e sujidade	10	7	—	12	13	5	29	44	10	24	29	3	4	76	13
Fadiga	30	36	20	27	44	16	65	28	43	32	33	33	40	46	20
Sensação de sonolência	33	22	7	12	25	11	23	17	17	18	24	20	13	18	17
Dor de cabeça	28	36	7	22	31	13	26	33	21	29	43	20	40	49	17
Náusea/Tontura	3	9	—	—	—	5	3	6	5	16	5	7	15	12	7
Dificuldade de concentração	8	17	—	2	—	5	13	17	7	13	5	13	8	15	4
Problemas nos olhos	23	16	20	12	25	9	10	67	24	29	24	13	13	36	17
Problemas nos nariz	8	17	7	12	44	12	10	50	12	40	19	23	5	18	13
Garganta seca	5	19	—	20	25	12	19	28	14	26	19	17	9	27	17
Tosse	5	9	—	5	13	5	10	17	10	21	14	7	4	15	13
Pele seca	15	10	—	20	19	8	26	39	17	13	24	27	4	9	11
Prurido na cabeça	13	3	—	5	6	1	—	—	7	—	10	7	—	—	7
Mãos secas	43	29	20	17	6	13	61	28	36	29	29	17	5	27	13
Outros problemas	10	7	—	2	13	5	7	6	—	3	5	3	—	9	0

QUADRO II

RESULTADOS RESPEITANTES AOS QUATRO GRUPOS OCUPACIONAIS EM PERCENTAGEM DE RESPOSTAS POSITIVAS EM RELAÇÃO AO AMBIENTE DE TRABALHO E SINTOMAS ACTUAIS. IGUALMENTE COMPARAÇÃO DE RESULTADOS DO HOSPITAL COM A MATERNIDADE

	Médicos 96/222 (43,3)	Enfermeiros 131/528 (39,9)	Administrativos 50/141 (35,5)	Serviços 259/607 (42,7)	Hospital 1298/582 (44,8)	Maternidade 145/180 (80,6)
Correntes de ar	13	15	34	29	23*	15
Temperaturas elevadas	21	12	30	25	22	35**
Variações de temperatura	13	31	16	23	22	30
Temperaturas baixas	6	19	2	10	11**	3
Ar bafiento	8	12	26	13	13	9
Ar seco	22	37	40	26	29	26
Cheiros desagradáveis	22	20	30	28	25**	12
Electricidade estática	6	13	2	11	10	8
Fumador passivo	29	27	28	16	22	17
Ruído	38	56	38	56	51**	37
Problemas de luminosidade	14	20	26	14	16	11
Poeira e sujidade	8	22	14	15	16*	10
Fadiga	23	41	32	36	34	30
Sensação de sonolência	15	24	20	15	18	12
Dor de cabeça	16	31	36	31	29	22
Náusea/Tontura	0	5	10	10	7	6
Dificuldade de concentração	4	12	12	9	9	5
Problemas nos olhos	13	21	28	20	19	16
Problemas no nariz	16	15	22	16	16	16
Garganta seca	9	21	26	14	16	17
Tosse	6	11	6	9	9	5
Pele seca	5	14	22	16	14	17
Prurido na cabeça	1	5	4	3	3	3
Mãos secas	6	42	16	23	24	30
Outros problemas	4	7	6	3	5*	2

** p < 0.01

* p < 0.05

MODELO DE INQUÉRITO

1-6	CLIMA INTERIOR		MM 040 EA Data Ano Mês Dia _ _ _ _ _ _ _	Nome	
	Ambiente de Trabalho			Instituição/Hospital/Companhia	
7-11	Número	_ _ _ _ _ _ _	Ocupação	_ _ _ _ _ _ _	Departamento/Serviço
12-21	Utilizador	_ _ _ _ _ _ _	Grupo	_ _ _ _ _ _ _	
A preencher pelo inquiridor					

Este Questionário ocupa-se do clima interior do seu ambiente de trabalho e dos possíveis sintomas que possam estar a afectá-lo.

FACTORES BÁSICOS

22-23	Ano de Nascimento 19 _ _	Ocupação	
24	Sexo M <input type="checkbox"/> 1 F <input type="checkbox"/> 2	Há quantos anos se encontra no presente lugar	
25	Fuma? Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 2	de trabalho? _ _ Anos	26- 27

AMBIENTE DE TRABALHO

Foi afectado os últimos três meses por alguns dos seguintes factores no local de trabalho?		Sim, com frequência (cada semana) (1)	Sim, algumas vezes (2)	Nunca (3)
28	Correntes de ar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
29	Temperatura ambiental demasiado elevada	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
30	Variações da temperatura ambiental	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
31	Temperatura ambiental demasiado baixa	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
32	Ar bafiento e desagradável	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
33	Ar seco	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
34	Cheiros desagradáveis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
35	Electricidade estática, por vezes causando choques	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
36	Exposição a fumo de tabaco (fumador passivo)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
37	Ruído	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
38	Luz insuficiente ou provocando encandeamento ou reflexos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
39	Poeiras e sujidade	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

CONDIÇÕES DE TRABALHO

	Sim, com frequência (1)	Sim, por vezes (2)	Não, raramente (3)	Não, nunca (4)	
40	Considera o seu trabalho interessante e estimulante?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
41	Tem muito trabalho para fazer?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
42	Tem alguma hipótese de influenciar as suas condições de trabalho?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
43	Os seus colegas ajudam-no nos problemas que encontra no seu trabalho?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Environment med, Dept. Occ. Med, Orebro; test version 8910/KA/BY ©

75-80 |_|_|_|_|_|_|_|

Andersson K and Stridh G. The use of Standardized questionnaires in building-related illness (BRI) and sick building syndrome (SBS) surveys. NATO/CCMS Pilot Study on indoor Air Quality, eds. F. Levy and M Maroni, National Institute of Occupational Health, Oslo, Norway, 1992.

Tradutor: J.J. Amaral-Mendes

Bibliografia publicada noutros periódicos, por investigadores e técnicos do INSA

Papers published by INSA staff in other scientific journals

1994/95

Biologia Médica

Bacteriologia

BAJANCA LAVADO, M.P.; PATO, M.V. – Antibiotic resistance in *Haemophilus influenzae* in Portugal. **APUA Newsletter**. 12: 4 (1994), p. 5 - 6.

BAJANCA LAVADO, M. P.; CASIN, I.; PATO, M.V. – *Haemophilus influenzae* producteurs de bétalactamase, isolés au Portugal de 1989 - 1992. **Pathol Biol**. 42: 5 (1994), p. 481 - 486.

BRANDÃO, J.C.; VERISSIMO, C.; ROSADO, M.L.; OSÓRIO ALMEIDA, M.L. – Tracing the origin of a *Candida albicans* infection by pulsed field gel electrophoresis. **J Micol Med**. 5: 1 (1995), p. 31 - 34.

CABRITA, J.; PIRES, I.; FERNANDES, E.; MONTEIRO, L.; PAULINO PEREIRA, J.; SOUSA GUERREIRO, A. – I solamento e caracterização de estirpes de *Helicobacter pylori* em doentes com patologia gastroduodenal benigna e carcinoma gástrico. **Rev Port Doenças Infecç**. 17: 1 (1994), p. 33 - 37.

CATRY, M.A.; BORREGO, M.J.; CARDOSO, J.; AZEVEDO, J.; SANTO, I. – Comparison of the Amplicor *Chlamydia trachomatis* test and cell culture for the detection of urogenital chlamydial infections. **Genitourin Med**. 71 (1995), p. 247 - 250.

MACHADO, J.; GRIMONT, P.A.D. – RNA gene restriction patterns of *Escherichia coli*. **Res Microbiol**. 146: 9 (1995), p. 709 - 720.

MONTEIRO, L.; CABRITA, J.; MEGRAUD, F. – Métodos de diagnóstico de *Helicobacter pylori*. **Rev Gastrenterol & Cirurgia**. 11: 55 (1994), p. 159 - 166.

PATO, M.V.; BELO DE CARVALHO, C.; TOMASZ, A. – Antibiotic susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*

isolates in Portugal. A multicenter study between 1989 and 1993. **Microb Drug Resist**. 1: 1 (1995) p. 59 - 69.

PAULO, A.; PIMENTEL, M.; VIEGAS, S.; PIRES, I.; DUARTE, A.; CABRITA, J.; GOMES, E. – *Cryptolepis sanguinolenta* activity against diarrhoeal bacteria. **J Ethnopharmacol**. 44 (1994), p. 73 - 77.

REIS, J.; LOPES, T.; GUERREIRO, S.; SANTOS, M.; PIRES, I.; MARTINS, F.; RAMOS, M.; PIRES, M.; QUINA, M. – Detecção ultra rápida do *Helicobacter pylori* (H.p.) valor do "One minut test". **Arq Hepato Gastroenterol Port**. 34: 6 (1994), p. 5 - 8.

RODRIGUES, J.; CABRITA, J.; SAAVEDRA, M.; PENHA GONÇALVES, A. – Desenvolvimento de um sistema de isotopia por bacteriófagos em *Campylobacter spp*. **Rev Port Farm**. 44 (1994), p. 188 - 192.

SEVERIN, A.; VAZ PATO, M.V.; FIGUEIREDO, A.M. S.; TOMASZ, A. – Drastic changes in the peptidoglycan composition of penicillin resistant laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. **FEMS Microbiol Letters**, 130 (1995), p. 31 - 35.

Hematologia / Química Clínica

FALEIRO, L.L.; RODRIGUES, M.O.; MARTINS, M.C. – Lipoprotein (a) in children and youngsters born in families with arterial hypertension. **Acta Cardiol**. 4 (1994), p. 1 - 2.

MARTINS, M.C.; RODRIGUES, M.O.; GOMES, M.A.; FONSECA, A.; FREITAS, M.M.; PEREIRA MIGUEL, M.J.; GOMES, E. – Programa de avaliação externa da qualidade em química clínica: visão de conjunto e avaliação após 11 anos de funcionamento. **Acta Med Port**. 7 (1994), p. 519 - 525.

MARTINS, M.C. – Garantia da Qualidade e acreditação de laboratórios clínicos: sua importância e

complementariedade. **Rev Port Anal Clin.** 1: 2 (1994), p. 139 - 159.

MARTINS, M.C.; GOMES, M.A. – EQAS in Portugal. **EQA news.** 6: 3 (1995), p. 54 - 55.

MARTINS, M.C.; RODRIGUES, M.O.; FONSECA, A. - Quality assurance programme in Portugal in the fields of clinical chemistry and haematology. **Ann Ist Super Sanità.** 31: 1 (1995), p. 37 - 41.

MARTINS, M.C.; RODRIGUES, M.O.; GOMES, M.A.; FONSECA, A.; FALEIRO, L.L. – Lípidos em crianças e jovens: um problema de Saúde Pública. **Acta Med Port.** 8: 9 (1995), p. 477 - 483.

PACHECO, P.; PERES, M.J.; FAUSTINO, P.; PISCHEDDA, C.; GONÇALVES, J.; CARVAJALES RAMOS, M.; SEIXAS, T.; MARTINS, M.C.; MOI, P.; LAVINHA, J. – β thalassaemia unlinked to the β globin gene interacts with sickle cell trait in a portuguese family. **Br J Haematol.** 91 (1995), p. 85 - 89.

PENEDA, J.; FONSECA, A.; MARTINS NEVES; MARTINS, M.C. – "Asialotransferrina", discriminante do consumo excessivo activo de alcool subagudo e crónico: utilidade clínica na doença hepática. **Acta Med Port.** 9 (1995), p. 103 - 111.

PERES, M.J.; ROMÃO, L.; CARREIRO, H.; PICANÇO, I.; BATALHA, L.; MAGALHÃES, H.A.; MARTINS, M.C.; LAVINHA, J. – Molecular basis of α -thalassaemia in a Portuguese population. **Hemoglobin.** 19: 6 (1995), p. 343 - 352.

Microbiologia Experimental

FRANCA, S.; VIEGAS, S.; MASCARENHAS, V.; PINTO, L. E DOUCETT, G.J. – Prokaryotes in association with a toxic *Alexandrium lusitanicum* in culture. In LASSUS, P.; et al. – **Harmful marine algal blooms.** Paris: Lavoisier Scientific Publications, 1995, p. 45 - 51.

MASCARENHAS, V.; ALVITO, P.; FRANCA, S.; SOUSA, I.; GAGO MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ VAZQUEZ, J.A. – The dinoflagellate *Alexandrium lusitanicum* isolated from the coast of Portugal: observation on toxicity and ultrastructure during growth phases. In LASSUS, P.; et al. – **Harmful marine algal blooms.** Paris: Lavoisier Science Publications, 1995, 71 - 76.

MINGUEZ, A.; FRANCA, S.; MORENO DIAZ DE LA ESPINA, E.S. – Dinoflagellates have an eukaryotic nuclear matrix with lamin-like proteins and topoisomerase. **J Cell Sci.** 107 (1994), p. 2861 - 2873.

SOUSA, I.; ALVITO, P.; FRANCA, S.; SAMPAYO, M.A.; GAGO MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ VAZQUEZ, J.A. –

Data on Paralytic Shellfish Toxins related to recent blooms in Portugal coastal waters. In LASSUS, P.; et al. – **Harmful marine algal blooms.** Paris: Lavoisier Science Publications, 1995, p. 71 - 76.

SOUSA, I.; ALVITO, P.; FRANCA, S.; SAMPAYO, M.A.; GAGO MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ VAZQUEZ, J.A. – Paralytic Shellfish Toxins related to recent blooms in Portugal coastal waters. In LASSUS, P.; et al. – **Harmful marine algal blooms.** Paris: Lavoisier Scientific Publications, 1995, p. 825 - 829.

Vectores e Doenças Infecciosas

BACELLAR, F.; DAWSON, J.E.; FILIPE, A.R. – Antibodies against *Rickettsiaceae* in dogs of Setúbal, Portugal. **Cent Eur J Public Health.** 2 (1995), p. 100 - 102.

BACELLAR, F.; MIRANDA, A.; FILIPE, A.R. – Diagnóstico da febre escarionodular: teste de Weil-Felix e prova de imunofluorescência indirecta. **Rev Port Doenças Infecc.** 17: 3 (1994), p. 179 - 182.

BACELLAR, F.; NÚNCIO, M.S.; ALVES, M.J.; FILIPE, A.R. – *Rickettsia slovaca*, un agente del grupo de las fiebres exantemáticas, en Portugal. **Enferm Infecc Microbiol Clin.** 13 (1995), p. 218 - 223.

BACELLAR, F.; REGNERY, R.L.; NÚNCIO, M.S.; FILIPE, A.R. – Genotypic evaluation of rickettsial isolates recovered from various species of ticks in Portugal. **Epidemiol Infecc.** 114 (1995), p. 169 - 178.

CAEIRO, V.; NÚNCIO, M.S.; SIMÕES, A.J.L.; VILA VIÇOSA, M.J.; SILVA, M.M. – Contribuição ao estudo dos parasitas do *Apodemus sylvaticus* (Linnaeus, 1758). **Med Vet.** 45 (1995), p. 37 - 40.

DAVID DE MORAIS, J.; ABRANCHES, J.; PARRA, J.; FILIPE, A.R.; NÚNCIO, M.S.; TEIXEIRA DA SILVA, M.H.; VALADAS, E. – Artrite de Lyme: a propósito dos primeiros casos diagnosticados em Portugal. **Rev Port Doenças Infecc.** 17: 3 (1994), p. 183 - 195.

FILIPE, A.R. – A família Bunyaviridae e os vírus das febres hemorrágicas. **Rev Port Doenças Infecc.** 17: 1 (1994), p. 27 - 31.

FILIPE, A.R. – A propósito da necessidade de formação e desenvolvimento da investigação científica em virologia em Portugal. In **Francisco António Gonçalves Ferreira: livro de homenagem.** Comissão Promotora da Homenagem, Lisboa, 1995, p. 381 - 385.

FILIPE, A.R.; ALVES, M.J. – Presença do vírus da coriomeningite linfocitária (LCMV) em Portugal. **Rev. Port. Doenç. Infecc.** 17: 4 (1994), p. 227 - 231.

FILIFE, A.R.; ALVES, M.J.; KARABATSOS, N.; MATOS, A.P.A.; NÚNCIO, M.S.; BACELLAR, F. — Palma virus, a new *Bunyaviridae* isolated from ticks in Portugal. *Intervirology*. 37 (1994), p. 348 - 351.

SAZ, J.V.; DAWSON, J.E.; BACELLAR, F.; MERINO, F.J.; FILIFE, A.R. — A proposito de la ehrlichiosis humana en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 12 (1994), p. 357-- 358.

SAZ, J.V.; NUNCIO, M.S.; MERINO, F.J.; AQUISE, M. - Alteraciones hepáticas y serología positiva frente a *Borrelia burgdorferi*. *Med Clin*. 102: 18 (1994), p. 40 - 41.

SAZ, J.V.; NUNCIO, S.; MERINO, F.J.; AQUISE, M.; MEDINA, J.; FILIFE, A.R. — Enfermedad de Lyme en la provincia de Soria: estudio clínicoepidemiológico. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 12: 2 (1994), p. 52 - 59.

TRAVASSOS SANTOS DIAS, J.A.; NÚNCIO, M.S.; GONÇALVES, A.C.B. — Contribuição para a elaboração de um inventário da fauna ixodoideológica (*Acarina-Ixodoidea*) de Portugal. *Garcia de Orta Série Zool*. 20: 1— 2 (1994), p. 49 - 68.

Virologia

HESS, G.; AVILLEZ, M.F.; LOURENÇO, M.H.; D'AGOSTINO, F.; GAMBIE, G.; PIOT, P.; VERCAUTEREN, G.; MICHL, U.; MELCHIOR, W.; BAYER, H. — Diagnosis of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection: multicenter evaluation of a newly developed anti HIV-1 and 2 enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol*. 32 :2 (1994), p. 403 - 406.

PÁDUA, E.; AVILLEZ, F. — Studies of HTLV-I/II seroprevalence among different population group. *J AIDS Hum Retrovirol*. 10 (1995), p. 262.

PARRY, J.V.; CONNELL, J.A.; REINBOTT, P.; GARCIA, A.B.; AVILLEZ, F.; MORTIMER, P.P. — GACPAT HIV1+2: A simple, inexpensive assay screen for, and discriminate between anti HIV-1 and anti HIV-2. *J Med Virol*. 45: 1 (1995), p. 10 - 16.

TELO, L.; MARQUES GOMES, M.J.; AVILLEZ, F.; FARIA, A.P.; CARVALHO, J.M.; SARAIVA, A.; VILLAR, M.; FONSECA SENLOS, M.L.; TELHADA, F.; MARQUES, A. — Anticorpos VIH 1 e VIH 2 em doentes com tuberculose: experiência de um trabalho realizado ao longo de 3 anos nas regiões de Lisboa, Barreiro e Santarém. *Rev Port Pneumol*. 1: 6 (1995), p. 497 - 504.

Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmissíveis

BASTOS, A.I.; CARVALHO TEIXEIRA, J.A.; PAIXÃO M.T. — As Mulheres e a SIDA. *Análise Psicológica*, 13: 1-2 (1995), p. 79 - 94.

CASTANHEIRA, J. L.; TORGAL GARCIA, J.; PALMA DOS REIS, R.; PAIXÃO M.T.; PRATES, I.; CONTREIRAS, T.; FERRAZ DE OLIVEIRA, F.; CORDEIRO FERREIRA, N. — Facilitar a aprendizagem da Saúde Pública: experiência do Departamento de Saúde Pública da Faculdade de Ciências Médicas. *Educ Médica*. 6: 1 (1995), p. 10 - 16.

DELMAS, M. C.; SCHWOEBEL, V.; HEISTERKAMP, S. H.; PAIXÃO, M.T. *et al.* — Recent trends in *Pneumocystis carinii* pneumonia (PCP) as AIDS-Defining Diseases in Nine European countries. *J AIDS Hum Retrovirol*. 9 (1995), p. 74 - 80.

MARINHO FALCÃO, I.; PAIXÃO, M.T. — Diarreia aguda em Portugal - 1992. *Saúde em Números*, 9: 1 (1994), p. 1- 4.

PAIXÃO, M.T. — 2221 casos de SIDA em Portugal. *Sida em Foco (CNLCS)*, 2 (1995), p. 13.

PAIXÃO, M.T. — SIDA: a epidemia em Portugal. *Sida em Foco (CNLCS)*, 1 (1994), p. 13.

SCHWOEBEL, V.; DELMAS, M. C.; ANCELLE-PARK, R. A.; PAIXÃO, M.T. *et al.* — Factors associated with extrapulmonary tuberculosis as AIDS-defining disease in Europe. *Tubercle and Lung Dis*. 76 (1995), p. 281 - 285.

Genética Humana

BOAVIDA, M.; ISIDRO, G.; VIEIRA, L.; ALVES, C.; MARSHALL, B. — O cancro, uma doença genética. *Rev Port Análises Clin*. 3 (1995), p. 177 - 189.

BOAVIDA, M.G. — Base molecular da tumorigénese coloretal. *Temas Médicos BYC*. 1 (1994), p. 1 - 5.

COX, S.A.; DE ALMEIDA, S.; ROSA, H.; LAVINHA, J.; VERGNAUD, G.; KRUSE, T. — EUROGEN Map of chromosome 16. In Spurr NK *et al* (eds) European genetic linkage map project (EUROGEN): Genetic maps based on the CEPH reference families. *Eur J Hum Genet*. 2 (1994), p. 234 - 235.

CYSTIC FIBROSIS GENETIC ANALYSIS CONSORTIUM — Population variation of common cystic fibrosis mutations. *Hum Mutat*. 4 (1994), p. 167 - 177.

- DAVID, D.; DE DEUS, G.; MORAIS, S.; LAVINHA, J. - Non-radioactive multiplex PCR-SSCP analysis of the molecular pathology of haemophilia B. XVth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Jerusalem. **Thromb Haemost**, 73 (1995), p. 1222.
- DAVID, D.; MOREIRA, I.; LALLOZ, M.R.A.; ROSA, H.A.V.; SCHWAAB, R.; MORAIS, S.; DINIZ, M.J.; DE DEUS, G.; CAMPOS, M.; LAVINHA, J.; JOHNSON, D.; TUDDENHAM, E.G.D. - Analysis of the essential sequences of the factor VIII gene in 12 hemophilia - A patients by single-strand conformation polymorphism (SSCP). **Blood Coag and Fibrinol**, 5 (1994), p. 257 - 264.
- DAVID, D.; TAVARES, A.; LAVINHA, J. - Characterization of a splicing mutation in the factor VIII gene at the RNA level. **Hum Genet**, 95 (1995), p. 109 - 111.
- DE ALMEIDA, S.; ALMEIDA, E.; LAVINHA, J.; REIMÃO PINTO, J.; TÁVORA, I.; PETERS, D.; BREUNING, M.; MARTINS PRATA, M. - Autosomal dominant polycystic kidney disease: evidence for the existence of a third locus in a Portuguese family. **Hum Genet**, 96 (1995), p. 83 - 88.
- ESAGUY, A.; VIEIRA, L.; AMBRÓSIO, P.; BOAVIDA, M.G. - Leucemia mieloide crónica: a propósito de um caso clínico. **Rev Port Pediatría**, 26: 1-2 (1995), p. 47 - 50.
- GONÇALVES, I.; GONÇALVES, J.; PÉRICION, B.; OSÓRIO-ALMEIDA, L.; KRISHNAMOORTHY, R.; LAVINHA, J. - A novel mosaic Bantu/Benin/Bantu β^0 haplotype found in several African populations. **Hum Genet**, 94 (1994), p. 101 - 103.
- GONÇALVES, J.; FAUSTINO, P.; ROSADO, L.; PERES, M.J.; MARTINS, M.C.; LAVINHA, J. - An african origin for an "American black" β^0 -thalassemia mutation? **Am J Hematol**, 46 (1994), p. 373 - 374.
- GONÇALVES, J.; LAVINHA, J. - The Y-associated XY275G (*low*) allele is common among the Portuguese. **Am J Hum Genet**, 55 (1994) p. 583 - 585.
- GONÇALVES, J.; MARQUES, R.; SILVA, G.; ROCHA, T.; SOUSA, A.; BOIEIRO, F.; CARREIRO, H.; MOURA, C.; SEBASTIÃO, C.; FELLOUS, M.; LAVINHA, J. - Azoospermia: contribuição da citogenética e da genética molecular. **Rev Port Med Reprod**, 19 (1994), p. 13 - 16.
- LAMY, S.; BRAGA, L.; PACHECO, P.; LAVINHA, J.; GOMES DA COSTA, G.; CORDEIRO FERREIRA, N. - Profilaxia das doenças hereditárias do eritrocito. **Acta Med Port**, 8 (1995), p. 355 - 358.
- MANNENS, M.; HOOVERS J.M.N.; REDECKER E.; FEINBERG A.P.; LITTLE P.; BOAVIDA M.; COAD N.; LECHOT N.J.; WESTERVELD A. - Parental imprinting of human chromosome region 11p15.3pter involved in the Beckwith-Wiedmann Syndrome and various human neoplasia. **Eur J Hum Genet**, 2 (1994), p. 3 - 23.
- MARSHALL, B.; ISIDRO, G.; BOAVIDA, G. - Silent Polymorphism of the APC gene in the Portuguese population. **Gene Geogr**, 9: 3 (1995), p. 207 - 210.
- PACHECO, P.; PERES, M.J.; FAUSTINO, P.; PISCHEDDA, C.; GONÇALVES, J.; CARVAJALES RAMOS, M.; SEIXAS, T.; MARTINS, M.C.; MOI, P.; LAVINHA, J. - β -thalassaemia unlinked to the β -globin gene interacts with sickle cell trait in a Portuguese family. **Br J Haematol**, 91 (1995), p. 85 - 89.
- PERES, M.J.; ROMÃO, L.; CARREIRO, H.; PIGANÇO, I.; BATALHA, L.; MAGALHÃES, H.A.; MARTINS, M.C.; LAVINHA, J. - Molecular Epidemiology of β^0 thalassaemia in a Portuguese population. **Hemoglobin**, 19 (1995), p.343 - 352
- SILVA, M.J.; CAROTHERS, A.; DIAS, A.; PEREIRA LUISA, J.H.; PIPER, J.; BOAVIDA, M.G. - Dose-dependence of radiation-induced micronuclei in cytokinesis blocked human lymphocytes. **Mutat Res**, 322 (1994), p. 117 - 128.
- THE EUROPEAN CONCERTED ACTION ON CYSTIC FIBROSIS - A quality control study of CFTR mutation screening in 40 different European laboratories. **Eur J Hum Genet**, 3 (1995), p. 235 - 245.
- VEIGA, I.; CONSTÂNCIA, M.; CARVALHAS, R.; VIANA, L.; GUIMARÃES DOS SANTOS.; LOPES, C.; BENTO, M. J.; MEINEDO, G.; ROSADINHO, I.; CASTEDO S. Estudo Genético de Famílias com Polipose Adenomatose Familiar do Cólon. **Arq Med**, 1995.

Nutrição, Microbiologia e Higiene dos Alimentos

- AMARAL, E., NOGUEIRA, R.; CAMACHO, M.A.; GARCIA, M.H.P.; GOES, M.D.; CALHAU, M.A.; MONTEIRO, B.; SEQUEIRA, D. - Leite gelificado: composição e valor nutritivo de variedades de fabrico nacional: subsídio para a tabela da composição dos alimentos portugueses. **Rev Port Nutr**, 6: 2 (1994) p. 53 - 61.
- AMARAL, E.; NOGUEIRA, R.; CAMACHO, M.A.; GARCIA, M.H.P.; GOES, M.D.; CALHAU, M.A.; MONTEIRO, B.; SEQUEIRA, D. - Leite gelificado: composição e valor nutritivo de variedades de fabrico

nacional: subsídio para a tabela da composição dos alimentos portugueses. In Livro Francisco António Gonçalves Ferreira – **Livro de homenagem**, Lisboa, 1995, p. 199 - 216.

AMORIM CRUZ, J.A. – A dieta mediterrânica revisitada: Editorial. **Rev Port Nutr.** 6: 2 (1994), p. 3 - 4.

AMORIM CRUZ, J.A. – Adição de vitaminas e sais minerais aos alimentos nos países desenvolvidos: Editorial **Rev Port Nutr.** 6: 1 (1994), p. 3 - 4.

AMORIM CRUZ, J.A. - Evolução da situação alimentar portuguesa e a adesão à União Europeia. **Rev Port Nutr.** 6: 3 (1994), p. 5 - 19.

AMORIM CRUZ, J.A. - Para quando um inquérito alimentar a nível nacional? : Editorial. **Rev Port Nutr.** 6: 3 (1994), p. 3 - 4.

AMORIM CRUZ, J.A. – Situação alimentar portuguesa, 1980-1992. In Francisco António Gonçalves Ferreira: - **Livro de homenagem**. Lisboa: Comissão Promotora da homenagem, 1995, p. 227 - 244.

AMORIM CRUZ, J.A. – Perspectiva nutricional e sanitária. In Balança alimentar portuguesa, Parte B. Lisboa: **INE**, 1994, p. 75 - 83.

CORREIA, C.; NOVAIS, M. R. – Pesquisa de *Salmonella* em ovos crus de galinha pelos métodos ISO/DIS 6579 e OSRT. **Rev Port Nutr.** 6: 1 (1994), p. 16 - 24.

MARTINS, I.; AMORIM CRUZ, J.A. – Rendimento dos alimentos portugueses cozinhados de origem vegetal. **Rev Port Nutr.** 6: 1 (1994), p. 5 - 15.

NOVAIS, M.R. – Toxinfecções alimentares mais frequentes entre nós: como preveni-las. **Guia do Consumidor**. Março (1995), p. 13.

Paramiloidose

ADAMS, D.; BUSSEL, A.; LEVIEIL, M.L.; COSTA, P.P.; BOULECHFAR, H.; SAID, G. – Echec du traitement intensif par échanges plasmatiques au cours des neuropathies amyloïdes héréditaires. **Annal Med Intern.** 145: suppl. 1 (1994), p. 24.

ALMEIDA, M.R.; AOYAMA-OISHI, N.; SAKAKY, Y.; HOLMGREN, G.; DRUGGE, U.; FERLINI, A.; SALVI, F.; MUNAR-QUÈS, M.; BENSON, M.D.; SKINNER, M.; COSTA, P.P.; SARAIVA, M.J.M. – Haplotype analysis of common transthyretin mutations. **Hum Genet.** 96 (1995), p. 350 - 354.

ALMEIDA, M.R.; SARAIVA, M.J.M. – TTR Leu 64 in FAP Kindred identified by PCR-RFLP analysis. **Amyloid: Int J Exp Clin Invest.** 1 (1994), p. 184 - 185.

COELHO, T.; SOUSA, A.; LOURENÇO, E.; RAMALHEIRA, J. – A study of 159 Portuguese patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) whose parents were both unaffected. **J Med Genet** 31 (1994), p. 293 - 299.

COSTA, P.M.P.; TEIXEIRA, A.; ESTÁCIO, A.; RIVAT, C.; COSTA, P.P. – Pre-clinical trial of transthyretin immunoadsorption of the treatment of familial amyloidotic polyneuropathy, portuguese type (preliminary results). **Annal Med Intern.** 145: suppl. 1 (1994), p. 24.

DAMAS, A.M.; SABASTIÃO, M.; COSTA, P.P.; SARAIVA, M.J.M. – Structural studies on FAP fibrils: removal of contaminants is essential for the interpretation of X-ray data. **Amyloid: Int J Exp Clin Invest.** 2 (1995), p. 173 - 178.

DAMAS, A.M.; SEBASTIÃO, M.; COSTA, P.P.; SARAIVA, M.J.M. – A fiber diffraction study of FAP fibrils. In KISILEWSKY, R.; et al. – *Amyloid and amyloidosis*. New York (N.Y.): Parthenon Publishing, 1994, p. 492.

FALCÃO DE FREITAS, A.; COSTA, P.P. – Amiloidose sistêmica. *Enciclopedia Latino-Americana de Hematologia*. 1994.

HOLMGREN, G.; COSTA, P.M.P.; ANDERSSON, C.; ASPLUND, K.; STEEN, L.; NYLANDER, P.P.; TEIXEIRA, A.; SARAIVA, M.J.M.; COSTA, P.P. – Geographical distribution of TTR Met 30 carriers in Northern Sweden. **J Med Genet.** 31 (1994), p. 293 - 299.

HOLMGREN, G.; COSTA, P.M.P.; ANDERSSON, C.; ASPLUND, K.; STEEN, L.; BECKMAN, L.; NYLANDER, P.O.; TEIXEIRA, A.; SARAIVA, M.J.M.; COSTA, P.P. – Geographical distribution of TTR Met 30 carriers in northern Sweden. **J Med Genet.** 31 (1994), p. 351 - 354.

JACOBSON, D.R.; ALVES, I.; SARAIVA, M.J.M.; BUXBAUM, J.N. – Transthyretin Ser 6 gene frequency in individuals without amyloidosis. **Hum Genet.** 95 (1995), p. 308 - 312.

LOBATO, L.; SOUSA, A.; JORGE, R.; COSTA, P.M.P.; AZEVEDO, J.; CASPURRO, S.; XAVIER, E. - Nephropathy in the familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) TTR Met 30: epidemiological and clinical study. **Kidney Intern.** 45 (1994), p. 287.

PALHA, J.A.; EPISKOPOU, V.; MAEDA, S.; SHIMADA, K.; GOTTESMAN, M.E.; SARAIVA, M.J.M. –Thyroid hormone metabolism in a transthyretin-null mouse strain. **J Biol Chem.** 269:52 (1994), p. 33135 - 33139.

PARRILHA, P.; LOPEZ-ANDREU, F.R.; RAMIREZ, P.; BUENO, F.S.; ROBLES, R.; MIRAS, M.; ESCRIBANO, J.B.; VICENTE, J.; ACOSTA, F.; MUNAR QUES, M.; COSTA, P.P.; TEIXEIRA, A. – Familial amyloidotic polyneuropathy type I (Andrade's disease): a new indication for liver transplant. **Transplantation**. 57:3 (1994), p. 473 - 475.

PARRILLA, P.; MUMAR, M.; RAMIREZ, P.; BUENO, F.S.; ANDREU, F.L.; COSTA, P.P. – Familial amyloidotic polyneuropathy should be a new indication for orthopic liver transplantation?. **Transplantation**. (1994).

SARAIVA, M.J.M. – Transthyretin mutations in health and disease. **Hum Mutation**. 5 (1995), p. 191 - 196.

SOUSA, A.; COELHO, T.; BARROS, J.; SEQUEIROS, S. - Genetic epidemiology of familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) - type I in Póvoa do Varzim and Vila do Conde. **Am J Med Genet**. 60:6 (1995), p. 512 - 521.

TORRES, M.F.; ALMEIDA, M.R.; SARAIVA, M.J.M. – TTR exon scanning in peripheral neuropathies. **Neuromusc Disord**. 5:3 (1995), p. 187 - 191.

VALLAR, L.; COSTA, P.M.P.; TEIXEIRA, A.; PFISTER, M.; BARROIS, R.; COSTA, P.P.; RIVAT, C. - Immunoabsorption procedure as a potential method for the specific β^2 -microglobulin removal from plasma of patients with chronic renal failure. **J Chromatogr B**. 664 (1995), p. 97 - 106.

Gripe

FEDSON, D.S.; HANNOUN, C.; LEESE, J.; SPRENGER, M.; HAMPSON, A.W.; BROJORGENSEN, K.; AHLBOM, A.; NOBLEBY, H.; VALLE, M.; OLAFSSON, O.; GARCIA, F.S.; GUGELMAN, R.; REBELO DE ANDRADE, H.; SNACKEN, R.; AMBROSCH, F. – Influenza vaccination in 18 developed countries, 1980-1992. **Vaccine**. 13: 7 (1995), p. 623 - 627.

GONÇALVES, G.; REBELO-DE-ANDRADE, H.; MAIA, J.C. – Calibração de um soro de referência com IgG antisarampo. **Arq Med**. 9: 6 (1995), p. 418 - 420.

REBELO DE ANDRADE, H.; MARINHO FALCÃO, I.; PAIXÃO, M.T.; SANTOS, A.S.; FALCÃO, J. M. – Programa de vigilância da gripe em Portugal: resultados do período 1990-1994. **Rev Port Doenças Infecç**. 18: 3-4 (1995), p. 195 - 200.

Epidemiologia e Bioestatística

MARINHO FALCÃO, I.; PAIXÃO, M.T. – Diarreia aguda em Portugal - 1992. **Saúde em Números**, 9: 1 (1994), p. 1 - 4.

MATIAS DIAS, C.; NOGUEIRA, P.; FALCÃO, J.M.; GOVÊA, M.F.; ROSA, A.V.; SÁ, J.V. – Colesterol total e colesterol das lipoproteínas de alta densidade em doentes com diabetes mellitus não insulino-dependentes. **Acta Med Port**. 8: 11 (1995), p. 619 - 628.

NOGUEIRA, P.; MATIAS DIAS, C.; FALCÃO, J.M. - Filhos e doenças das mães: qualidade da informação do estudo-piloto. **Rev Port Saúde Públ**. 13: 1 (1995), p. 29 - 38.

NOGUEIRA, P.; OLIVEIRA, M.O.; FALCÃO, J.M. - Eficácia da vacina, cobertura vacinal da população e proporção de doentes vacinados. **Saúde em Números**. 9 (1994), p. 12 - 15.

Alcoologia

PENEDA, J. – Consumo de bebidas alcoólicas na prevenção da doença cardiovascular? In Francisco António Gonçalves Ferreira: **Livro de homenagem**. Lisboa Comissão Promotora da Homenagem, 1995, p. 293 - 297.

PENEDA, J. – Influência da toxicidade combinada no desenvolvimento da lesão pancreática alcoólica. **Acta Med Port**. 8 (1995), p. 137 - 143.

PENEDA, J.; BAPTISTA, A.; LOPES, J.M. – Interaction of the constituents of alcoholic beverages in the promotion of liver damage. **Acta Med Port**. 7 (1994) p. 51 - 55.

NORMAS PARA A PREPARAÇÃO DE MANUSCRITOS

Os «Arquivos do INSA» publicam artigos, onde se relatam e discutem os resultados de actividades de I&D, na área das Ciências da Saúde.

Os trabalhos deverão ser originais (isto é, nunca terem sido publicados, total ou parcialmente, e não terem sido simultaneamente submetidos a apreciação noutra revista nacional ou estrangeira).

Os manuscritos devem ser enviados à Direcção do INSA, que os remeterá ao Conselho Redactorial dos Arquivos, o qual, com base no parecer de, pelo menos, dois peritos, procederá ao respectivo encaminhamento.

Requisitos a que os manuscritos devem obedecer:

Texto em português ou inglês, dactilografado só de um lado, em papel branco, formato A4, a dois espaços, e com uma margem de ambos os lados da página (c. 2,5 cm).

Fazer acompanhar o original de duas cópias do mesmo.

Recomenda-se que o texto não exceda as 25 páginas, incluindo quadros e figuras.

As folhas serão numeradas, por ordem sequencial, no canto superior direito.

O texto deverá ter a seguinte estrutura: Autor, Título, Resumo, Introdução, Materiais e Métodos (incluindo, se aplicável, a caracterização da amostra populacional), Resultados, Discussão e Bibliografia.

1. APRESENTAR, EM FOLHAS SEPARADAS, OS SEQUINTE ELEMENTOS:**1.1 Identificação**

- Título do artigo, que deverá ser curto
- Subtítulo, se se justificar
- Nome do(s) Autor(es), que deu(deram) contribuição material
- Organismo(s) em que o(s) Autor(es) exerce(m) a sua actividade

1.2 Resumo

- Em português e em inglês (Summary)
- Deve ser sucinto (máximo 200 palavras) e conter os seguintes elementos essenciais:
 - Objectivo do estudo em causa
 - Referência aos métodos nele utilizados
 - As principais conclusões
- O resumo em inglês deverá ser encabeçado pelo título do artigo, na mesma língua

1.3 Palavras-chave

- Fazer acompanhar os resumos de 3 a 5 palavras-chave (em português e inglês), as quais definam bem o conteúdo do artigo. Não esquecer que uma palavra-chave pode ser constituída por dois segmentos. Ex.: Rubéola-Epidemiologia.

1.4 Quadros

- Apresentação em folhas autónomas, com título e legenda próprias.
- Numeração individual, em números romanos.
- Recomenda-se que os quadros não sejam em número exagerado, e que cada um se baste a si próprio, sem recurso a quadros suplementares.
- Os quadros devem ser citados no texto.
- No verso de cada quadro, indicar a respectiva localização no texto.

1.5 Figuras

- De boa qualidade, que permita reprodução fotográfica.
- Numeração em algarismos árabes.
- Legendas em folhas A4, à parte.

Gráficos

A tinta da China preta, sobre papel vegetal ou produzidos em impressora de boa qualidade.

Títulos e legendas, inscritos no verso de fotocópia dos mesmos.

Fotografias

A preto e branco, em papel brilhante, e com bom contraste.

Não deixar impressões digitais.

N.B.: *No verso de cada Quadro ou Figura deve ser colado um autocolante, com o nome do(s) Autor(es), o início do Título, número de ordem e localização, dentro do trabalho.*

1.6 Agradecimentos

- Em poucas linhas, e apresentados também em folha à parte.

1.7 Bibliografia

- Referências bibliográficas, precedidas de um número de ordem sequencial.
- Este número será usado no texto, quando se fizer, a respectiva citação, de modo a remeter o leitor para a Bibliografia apresentada no final do artigo. Nunca repetir a referência em nota de rodapé.
- O título do periódico pode ser abreviado, de acordo com a norma internacional de abreviaturas, utilizada pelo Index Medicus.
- Utilizar a Norma Portuguesa NP-405-1 (IPQ).

2. NP-405-1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: DOCUMENTOS IMPRESSOS**EXEMPLIFICAÇÃO DE CASOS-TIPO MAIS FREQUENTES****2.1 Monografia (=Livro)****Com um Autor**

LEVY, JAY A. — HIV and the pathogenesis of AIDS. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1994.

Até três Autores

DHILLON, H.S.; PHILIP, L. — Health promotion and community action for health in developing countries. Geneva: WHO, 1994.

Mais de três Autores

MODELL, B.; et al.* — Les services génétiques au sein de la collectivité en Europe: rapport sur une enquête. Copenhague: OMS, Bureau Régional de l'Europe, 1993. (Série Européenne; 38).

Contribuições em monografias (Capítulos)

Faz-se a entrada pelo **Autor** e **Título do Capítulo** a referir, seguido de **In** e o **Autor principal da obra** e respectivo **Título da mesma**, bem como as **páginas-limite do Capítulo em questão**.

SCHEFLEN, A.E. — Systèmes de la communication humaine. In WINKIN, Yves — La nouvelle communication. Paris: Seuil, 1981, p. 145-57.

Colectividade — Autor

Quando é subordinada a outra colectividade, o nome dessa constará em primeiro lugar. Ministérios, órgãos legislativos, judiciais, administrativos, civis ou religiosos ficam subordinados à circunscrição territorial a que dizem respeito.

UNIVERSIDADE DE COIMBRA. Faculdade de Ciências. Departamento de Química — [... seguem-se os elementos duma referência bibliográfica (V. ex. 1.1)]

PORTUGAL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Saúde — [... seguem-se os elementos duma referência bibliográfica (V. ex. 1.1)]

* et al. = abreviatura da expressão latina «et alii», que significa «e outros».

2.2. Artigos de publicações em série (Periódicos)

Cumpra-se o estabelecido para as entradas de Autor (V. ex. 1.1 a 1.4), e usa-se a seguinte descrição bibliográfica, para todos os restantes elementos:

BOSHOFF, C.; et al. — Kaposi's sarcoma: associated herpesvirus infects endothelial and spindle cells. *Nature Medicine*. New York, N.Y.*. 1: 12 (1995), 1274-78.

2.3. Comunicações em congressos, jornadas, etc.

LECHNER, M.C. — Regulação da expressão de genes de citocromo P450 no fígado. In JORNADAS LUSO-ESPAÑOLAS DE GENÉTICA, 30.^{as}, Lisboa, 1995, p. C71.

[Caso idêntico ao das contribuições em monografias — (V. 1.4)]

Se se referir a publicação na totalidade, e não apenas parte:

JORNADAS LUSO-ESPAÑOLAS DE GENÉTICA, 30.^{as}, Lisboa, 1995 — Livro de Comunicações. Lisboa: Sociedade Portuguesa de Genética, 1995.

2.4. Abreviaturas¹

Definir as abreviaturas na sua primeira ocorrência no texto. Exemplo: «vírus da imunodeficiência humana (VIH)»

Podem utilizar-se, nos seguintes casos:

→ AUTORES, EDITORES LITERÁRIOS, etc.
Ex.: PIAGET, J.

→ ESTADOS, PROVÍNCIAS, PAÍSES, etc.²
Ex.: E.U.A., GB

→ TÍTULOS DE PERIÓDICOS³
Ex.: *Clinical Chemistry*
Clin. Chem.

Journal of Medical Genetics
J. Med. Genet.

→ PALAVRAS E TERMOS CORRENTES
Ex.: edição = ed.
página = p.
volume = vol.

3. SEPARATAS

Cada autor receberá 20 separatas grátis e 1 exemplar dos Arquivos.

4. ENDEREÇO EDITORIAL

Os manuscritos deverão ser enviados para:

Director do
Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
Av. Padre Cruz
1699 LISBOA CODEX

Telefone: (01) 751 92 00
Telefax: (01) 759 04 41
Conselho Redactorial: (01) 751 93 18/81 (directo)

1. Consulte-se a NP-3680, 1989: Descrição e referências bibliográficas: abreviatura de palavras típicas.
2. O local de publicação é um elemento facultativo. Recomenda-se, no entanto, o seu uso, quando possa ocasionar dúvidas. Ex.: Cambridge (Inglaterra) — Cambridge, Massachusetts (Estados Unidos da América).
3. Aconselha-se consulta da lista de títulos do Index Medicus, contida na base de dados MEDLINE

