



Observações

— Boletim Epidemiológico

editorial_

Observar as doenças infecciosas

A Comissão Europeia adotou a partir de 2008 as definições de caso para todas doenças infecciosas sob vigilância a nível europeu. Este foi o culminar de vários anos de trabalho pelo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) e seus parceiros dos institutos nacionais de saúde pública, sendo uma conquista que todos nós nos devemos orgulhar.

Estas definições de caso a par da informação clínica e epidemiológica têm como suporte principal a informação laboratorial.

A sua aplicação continua a ser um desafio significativo onde a capacidade de diagnóstico laboratorial para testar alguns agentes é extremamente limitada. O resultado é que existem lacunas com intervenientes simplesmente a não comunicarem os dados de algumas doenças o que constitui motivo de preocupação.

Sabemos que os orçamentos de saúde pública continuam a estar sob pressão e que a vigilância não é necessariamente a principal prioridade, no entanto devemos trabalhar com o objetivo de continuar a estabelecer pontes com os restantes intervenientes neste processo de forma que a vigilância epidemiológica destas doenças melhore e se torne mais efetiva permitindo uma mais adequada informação aos decisores políticos.

Em Portugal, o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge desenha um papel de garante de que existe capacidade laboratorial instalada para responder a qualquer desafio nesta área, constituindo o *Boletim Epidemiológico Observações* uma pequena amostra do que vamos fazendo.

Este número apresenta de forma resumida alguns dados sobre doenças infecciosas de origem respiratória, gastrointestinais, parasitárias e fúngicas e contou para a sua obtenção, entre outros, com a intervenção dos laboratórios de referência procurando desta forma contribuir para um melhor conhecimento nacional das doenças infecciosas.

Jorge Machado

Coordenador do Departamento de Doenças Infecciosas do INSA



Instituto **Nacional de Saúde**
Doutor Ricardo Jorge

neste número_

Editorial

Observar as doenças infecciosas Jorge Machado p 01

Artigos Breves

Infeções Respiratórias

1_ Diagnóstico diferencial de vírus respiratórios em casos de síndrome gripal no inverno 2013/2014 p 03

Pedro Pechirra, Paula Cristóvão, Ana Carina Maia, Patrícia Conde, Cristina Furtado, Raquel Guiomar

2_ Suscetibilidade dos vírus da gripe aos antivirais inibidores da neuraminidase em Portugal, 2009-2014 p 07

Patrícia Conde, Pedro Pechirra, Paula Cristóvão, Ana Carina Maia, Cristina Furtado, Raquel Guiomar

3_ Tuberculose multirresistente e extensivamente resistente em Portugal, 2008-2013 p 11

Rita Macedo, Anabela Santos Silva, Maria João Simões

4_ Infeção invasiva a *Haemophilus influenzae* entre 2002 e 2010: caracterização molecular e padrão de suscetibilidade aos antibióticos p 15

Maria Paula Bajanca-Lavado, Alexandra S. Simões, Célia Rodrigues Betencourt, Raquel Sá-Leão (em nome de "The Portuguese Group for the Study of *Haemophilus influenzae* invasive infection")

Infeções Parasitárias e Fúngicas

5_ Triquinose humana: estudo observacional em dois grupos populacionais expostos à infeção por *Trichinella* sp p 20

Idalina Ferreira, Susana Martins, Tânia Reis, Anabela Vilares, Alexandra Mendes, Susana Cardoso, Maria do Céu Costa, Maria João Gargaté

6_ Leishmaniose: confirmação laboratorial de casos clínicos suspeitos de infeção entre 2008 e 2013 p 23

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

7_ *Tinea capitis*: análise retrospectiva de casos diagnosticados entre 2004 e 2013 p 26

Raquel Sabino, Helena Parada, João Brandão, Cristina Furtado, Soraia Carvalheiro, Cristina Veríssimo

8_ Genotipagem de *Candida parapsilosis* com marcadores de DNA microssatélite: uma ferramenta para o estudo e controlo das infeções hospitalares p 30

Raquel Sabino, Paula Sampaio, Cristina Verissimo, Célia Pais

Infeções Gastrointestinais

9_ Estudo observacional da infeção por *Campylobacter* spp. em doentes com diarreia aguda p 34

Mónica Oleastro, Andrea Santos, Cláudia Júlio

10_ Infeções gastrointestinais parasitárias em doentes sintomáticos: estudo observacional, setembro-novembro 2012 p 37

Cláudia Júlio, Mónica Oleastro

11_ Novo genótipo de norovírus em doentes com gastroenterite aguda, 2011-2013 p 41

Inês Costa, João Mesquita, Elisabete Veiga, Mónica Oleastro, Maria São José Nascimento

12_ *Salmonella enterica*: serotipos menos frequentes com importância em patologia humana, caracterizados no INSA entre 2002-2013 p 44

Leonor Silveira, Adelaide Marques, João Santos, Cristina Furtado, Jorge Machado

13_ Enterotoxinas estafilocócicas em géneros alimentícios p 48

Rosália Furtado, Anabela Coelho, Cristina Belo Correia, Margarida Saraiva, Isabel Campos Cunha, Maria Antónia Calhau

14_ *Bacillus cereus* em fórmulas desidratadas para lactentes: uma preocupação? p 51

Ricardo Assunção, Rosália Furtado, Cristina Belo Correia, Paula Alvito



Diagnóstico diferencial de vírus respiratórios em casos de síndrome gripal no inverno 2013/2014

Pedro Pechirra¹, Paula Cristóvão¹, Ana Carina Maia¹,
Patrícia Conde¹, Cristina Furtado², Raquel Guiomar¹

raquel.guiomar@insa.min-saude.pt

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

(2) Unidade de Referência e Vigilância Epidemiológica. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

Introdução

O quadro clínico das infeções respiratórias virais é muito semelhante, sendo difícil efetuar um diagnóstico etiológico baseado exclusivamente em critérios clínicos (1).

Motivado pela existência de informação escassa relativamente à etiologia viral da síndrome gripal em Portugal, o Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e Outros Vírus Respiratórios do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) tem realizado, nas últimas 4 épocas de inverno, o diagnóstico diferencial de vírus respiratórios, nos casos de síndrome gripal (SG) notificados no âmbito do Programa Nacional de Vigilância da Gripe.

Objetivo

Este estudo tem como primeiro objetivo caracterizar a etiologia do síndrome gripal, através do diagnóstico diferencial de vírus respiratórios, em casos de SG analisados no Laboratório Nacional de Referência do INSA no inverno 2013/2014. Constitui segundo objetivo conhecer a distribuição temporal dos vírus respiratórios detetados ao longo deste mesmo período de tempo.

Material e métodos

No âmbito do Programa Nacional de Vigilância da Gripe, e de acordo com a definição do *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) (2), são considerados casos de SG os doentes com início súbito de sintomas, e que descreveram a presença de pelo menos um sinal/sintoma sistémico e outro respiratório. Durante a época 2013/2014, foi efetuada a colheita de um exsudado nasofa-

ríngeo a 859 doentes com quadro clínico SG e realizada a pesquisa laboratorial dos vírus influenza: do tipo A (subtipos H1pdm09 e H3), e do tipo B (linhagens Yamagata e Victoria).

Nos casos de SG com resultados negativos para o vírus da gripe (n=395), foi realizado o diagnóstico diferencial de outros vírus respiratórios, nomeadamente: o vírus sincicial respiratório do tipo A e B (RSV A e RSV B), o rinovírus humano (hRV), o vírus parainfluenza dos tipos 1, 2 e 3 (PIV1, PIV2 e PIV3), o coronavírus humano (hCoV-229E, hCoV-OC43 e hCoV-NL63), o adenovírus (AdV) e o metapneumovírus humano (hMPV). Para o diagnóstico diferencial dos vírus respiratórios foi utilizada a metodologia de PCR em tempo real, em multiplex (3,4), possibilitando, desta forma, a deteção de um ou mais agentes (infeções múltiplas) envolvidos na infeção respiratória.

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

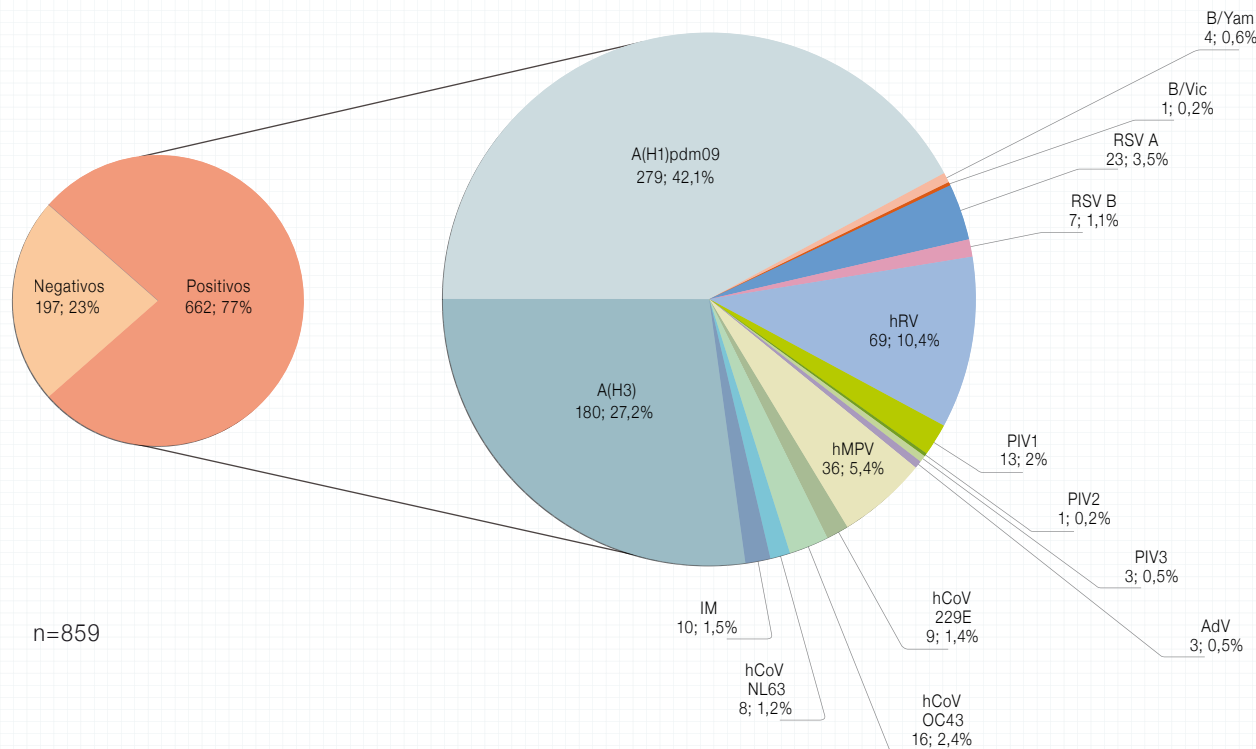
Resultados

O agente etiológico foi identificado em 77,1% (662/859) dos casos de SG analisados. O vírus da gripe foi o agente respiratório detetado com maior frequência, correspondendo a 70,1% (464/662) dos casos de SG onde foi identificado o agente etiológico, seguido do rinovírus humano detetado em 10,4% (69/662) dos casos de SG positivos (Gráfico 1).

Para além dos vírus influenza, foram detetados o metapneumovírus humano (5,4%; 36/662), o coronavírus humano (5,0%; 33/662) e o vírus sincicial respiratório (4,5%; 30/662). Os vírus parainfluenza e adenovírus foram detetados em menor número e de forma esporádica no período em estudo (2,6% e 0,5% dos casos de SG positivos, respectivamente). Registaram-se também 10 (1,5%) casos de infeção mista, de 2 ou mais vírus respiratórios, na sua maioria associadas ao coronavírus humano (Gráfico 1).

A maior percentagem de casos positivos para os vírus respiratórios analisados foi observada em crianças até aos 4 anos (Tabela 1).

Gráfico 1: Distribuição percentual dos casos de SG por diagnóstico diferencial de vírus respiratórios, época 2013/2014.



IM=infeção mista; A(H3)= vírus da gripe A(H3); A(H1)pdm09= vírus da gripe A(H1)pdm09; B/Yam= vírus da gripe B linhagem Yamagata; B/Vic= vírus da gripe B linhagem Victoria; RSV A= vírus sincicial respiratório do tipo A; RSV B= vírus sincicial respiratório do tipo B; hRV= rinovírus humano; PIV1, PIV2 e PIV3= vírus parainfluenza dos tipos 1, 2 e 3; hCoV-229E= coronavírus humano 229E; hCoV-OC43= coronavírus humano OC43; hCoV-NL63= coronavírus humano NL63; AdV= adenovírus e hMPV= metapneumovírus humano.

Tabela 1: Distribuição percentual de casos de SG positivos para um agente viral respiratório por grupo etário, época 2013/2014.

Grupo Etário (anos)	Casos de SG *	Casos Positivos (%)
0 - 4	58	55 (94,8)
5 - 14	85	66 (77,6)
15 - 44	402	314 (78,1)
45 - 64	209	150 (71,8)
65 +	97	70 (72,2)

* Não estão incluídos 8 casos para os quais não foi obtida informação sobre a idade.

O vírus influenza foi o agente predominante em todos os grupos etários. Quando se analisaram os restantes vírus respiratórios, o rinovírus foi o agente detetado com maior frequência em todos os grupos etários, à exceção das crianças até aos 4 anos de idade, onde predominou o vírus sincicial respiratório. O metapneumovirus humano e o coronavírus foram detetados em todos os grupos etários com maior expressão nos indivíduos com idade superior a 15 anos (Gráfico 2).

Quanto à distribuição temporal dos vírus respiratórios durante a época gripal 2013/2014 verificou-se que, ao longo de todo o período de vigilância da gripe, foi detetado o rinovírus. O vírus sincicial respiratório, o metapneumovirus e o coronavírus circularam em simultâneo com o vírus da gripe, entre dezembro de 2013 e o fim do mês de fevereiro de 2014 (Gráfico 3).

Gráfico 2: Distribuição dos vírus da gripe, rinovírus (hRV), vírus sincicial respiratório (RSV), metapneumovírus humano (hMPV) e coronavírus humano (hCoV) por grupo etário, época 2013/2014.

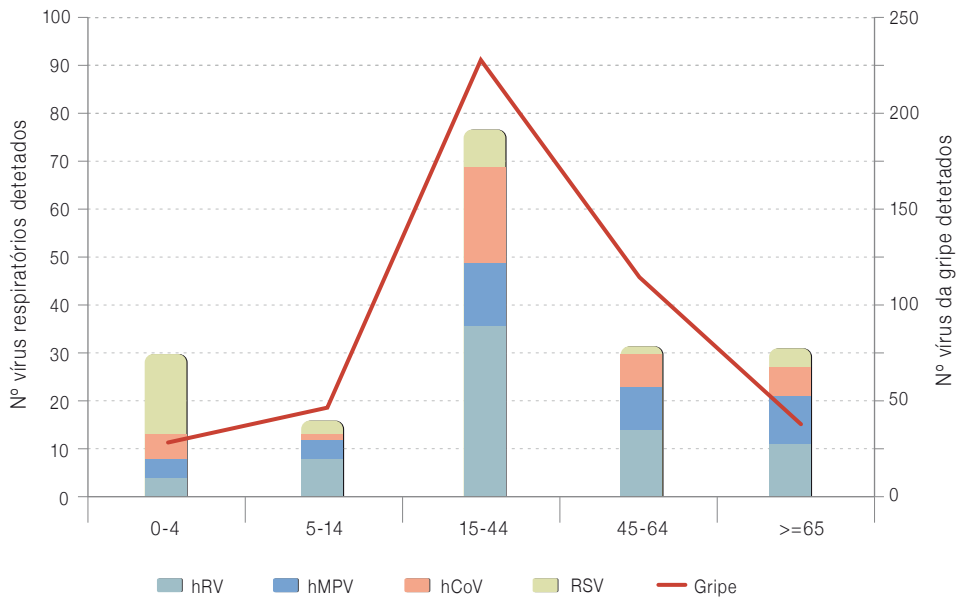
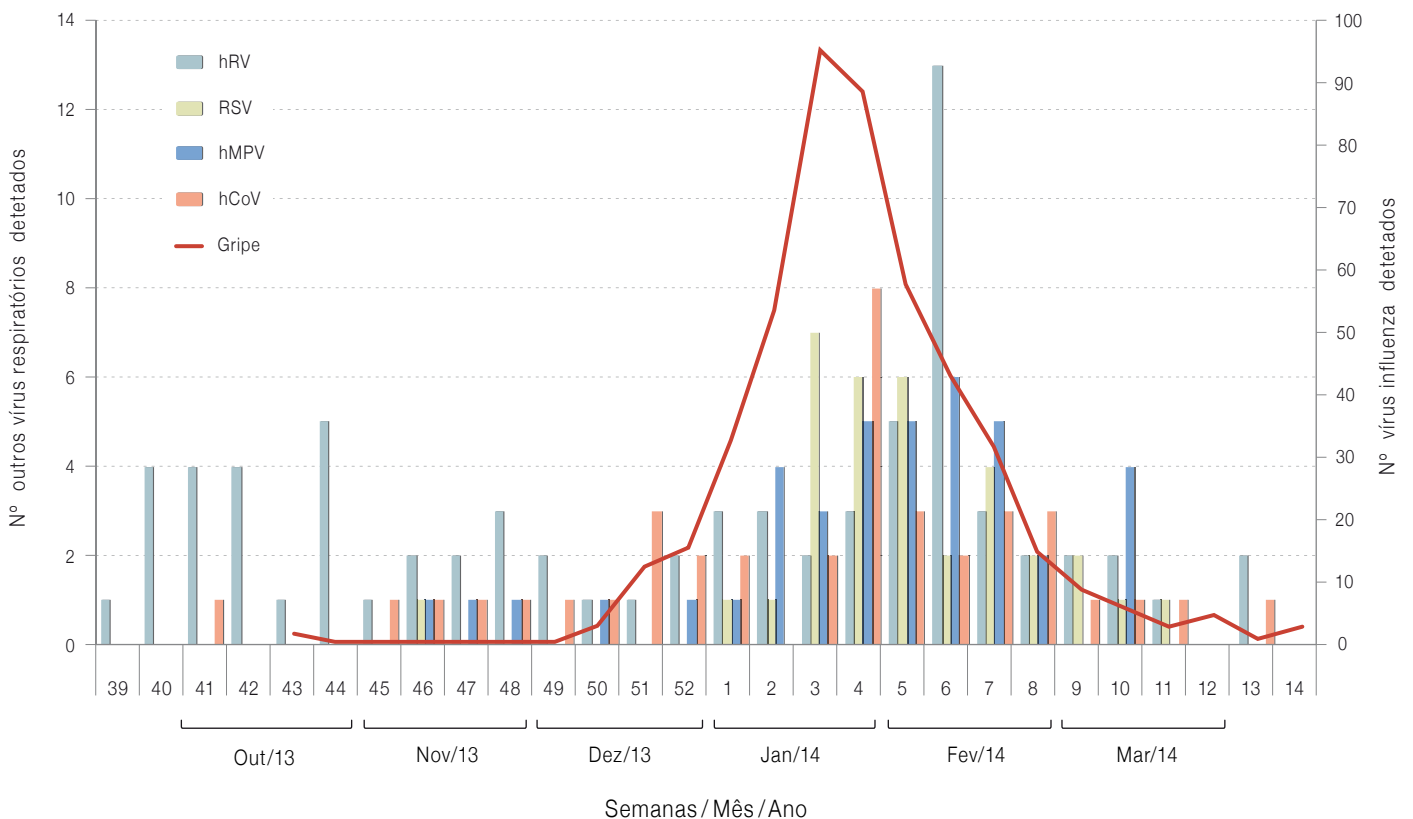


Gráfico 3: Distribuição dos vírus da gripe, rinovírus (hRV), vírus sincicial respiratório (RSV), metapneumovírus humano (hMPV) e coronavírus humano (hCoV), por semana de início da doença, época 2013/2014.





_Discussão e conclusão

À semelhança das 3 épocas anteriores (5,6), também na época 2013/2014, o rinovírus humano (10,4%) foi o agente patogénico mais detetado nos casos de SG, para além do vírus influenza (70,1%). O rinovírus humano é um vírus respiratório que se encontra em circulação ao longo de toda a época de vigilância laboratorial da gripe (entre outubro e maio do ano seguinte). Sendo um dos agentes, associado ao SG, mais comum, infeta a população em geral nos primeiros anos de vida (7) e é responsável pela exacerbação de doenças respiratórias crónicas em crianças e adultos (8).

Em 2013/2014, os vírus hMPV, hCoV e RSV foram detetados em 5,4%, 5,0% e 4,5% dos casos de SG, respectivamente. O coronavírus humano, pesquisado nesta época pela primeira vez em casos de SG, foi detetado no mesmo período de circulação do vírus da gripe. A deteção de metapneumovírus humano em 5,4% dos casos de SG contrasta com a frequência registada na época anterior (2,1%) (9). Este facto, alerta, só por si, para a importância de se continuar a pesquisar metapneumovírus humano em casos SG nas épocas futuras.

A frequência do RSV na presente época (4,5%) foi inferior à da época passada (9%), mas semelhante à registada nas épocas de 2010/2011 (4,7%) e 2011/2012 (5,1%) (9,10,11). Ao contrário das épocas anteriores, o RSV representou uma maior proporção nos casos de SG nas crianças até aos 4 anos.

O hMPV e o RSV foram detetados durante o período epidémico da gripe. Estes dois vírus, com uma epidemiologia muito semelhante (12) são uma das causas mais comuns de infeção respiratória nas crianças nos primeiros anos de vida, constituindo este grupo de crianças uma importante fonte de transmissão, quer aos seus cuidadores, quer a grupos vulneráveis de maior risco (12,13).

O vírus parainfluenza e o adenovírus, tal como nos invernos anteriores, foram detetados em baixo número e de forma esporádica (5,6).

Em conclusão, este estudo evidenciou que 30% dos agentes etiológicos detetados nos casos de SG analisados, na época 2013/2014, correspondem a outros vírus respiratórios que circulam em simultâneo com o vírus da gripe.

Acrescente-se, que só o diagnóstico laboratorial da infeção respiratória e o conhecimento atempado do agente etiológico responsável permitirá um tratamento adequado e a implementação de medidas de prevenção da transmissão da infeção, com particular importância e impacto nos grupos populacionais com risco acrescido.

_Agradecimentos

À Rede de Médicos-Sentinela, Rede de Serviços de Urgência/Obstetria e médicos participantes no projeto EuroEva/I-MOVE que contribuem para a vigilância da gripe em Portugal; Ao Baltazar Nunes e Ausenda Machado, do Departamento de Epidemiologia do INSA, pela coordenação do estudo EuroEva, componente portuguesa do projeto europeu multicêntrico I-MOVE ("Monitoring vaccine effectiveness during influenza seasons and pandemics in Europe").

Referências bibliográficas:

- (1) Choudhary ML, Anand SP, Heydari M, et al. Development of a multiplex one step RT-PCR that detects eighteen respiratory viruses in clinical specimens and comparison with real time RT-PCR. *J Virol Methods*. 2013;189(1):15-9.
- (2) European Centre for Disease Prevention and Control. Influenza case definitions [Em linha]. [consult. 5/2/2013]. [LINK](#)
- (3) Gunson RN, Collins TC, Carman WF. Real-time RT-PCR detection of 12 respiratory viral infections in four triplex reactions. *J Clin Virol*. 2005;33(4) 341-4.
- (4) Tiveljung-Lindell A, Rotzén-Östlund M, Gupta S, et al. Development and implementation of a molecular diagnostic platform for daily rapid detection of 15 respiratory viruses. *J Med Virol*. 2009;81(1):167-75.
- (5) Guiomar R, Cristóvão P, Conde P, et al. Vírus respiratórios e gripe entre 2010 e 2013, em Portugal. *Boletim Epidemiológico Observações*. 2013 abr-jun;2(4):9-12 [LINK](#)
- (6) Guiomar R, Cristóvão P, Conde P, et al. Vigilância Epidemiológica da Gripe em Portugal no Inverno 2012/2013. *Boletim Epidemiológico Observações*. 2013 out-dez;2(6):22-5. [LINK](#)
- (7) Papadopoulos N, Johnston S. The rhinovirus – not such an innocent?. *QJM*. 2001;94(1):1-3. [LINK](#)
- (8) Regamey N, Kaiser L. Rhinovirus infections in infants: is respiratory syncytial virus ready for the challenge?. *Eur Respir J*. 2008;32(2):249-51. [LINK](#)
- (9) Guiomar R, Conde P, Cristóvão P, et al. Programa Nacional de Vigilância da Gripe: relatório da época 2012/2013. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2013. [LINK](#)
- (10) Gonçalves P, Pechirra P, Conde P, et al. Programa Nacional de Vigilância da Gripe: relatório da época 2010/2011. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2012. [LINK](#)
- (11) Gonçalves P, Pechirra P, Conde P, et al. Programa Nacional de Vigilância da Gripe: relatório da época 2011/2012. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2013. [LINK](#)
- (12) Papenburg J, Boivin G. The distinguishing features of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol*. 2010;20(4):245-60.
- (13) MacIntyre CR, Ridda I, Seale H, et al. Respiratory viruses transmission from children to adults within a household. *Vaccine*. 2012;30(19) 3009-14.



Suscetibilidade dos vírus da gripe aos antivirais inibidores da neuraminidase em Portugal, 2009-2014

Patrícia Conde¹, Pedro Pechirra¹, Paula Cristóvão¹,
Ana Carina Maia¹, Cristina Furtado², Raquel Guiomar¹

raquel.guiomar@insa.min-saude.pt

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

(2) Unidade de Referência e Vigilância Epidemiológica. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

Introdução

O impacto das epidemias anuais de gripe na morbidade e mortalidade tem sido alvo da maior atenção desde longa data (1). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a gripe é responsável por um quarto a meio milhão de óbitos por ano em todo o mundo.

A vacinação continua a ser a principal medida de prevenção contra a gripe, mesmo, e apesar, do longo período para a produção da vacina e respetiva distribuição pela população. Os antivirais têm também uma longa e extensa história no tratamento e prevenção da gripe, sendo hoje uma importante opção para o tratamento da doença, bem como a medida de prevenção de eleição numa fase inicial de uma pandemia (2). O reduzido número de medicamentos autorizados para o tratamento da gripe levanta algumas preocupações, particularmente no que diz respeito às resistências aos antivirais (2), sendo, por isso, fundamental o estudo dos mecanismos de resistência aos antivirais inibidores da neuraminidase. As mutações constantes do vírus da gripe requerem, também, uma monitorização contínua especialmente das já descritas como associadas a alterações da suscetibilidade aos antivirais, quer a nível do ambulatório, quer a nível hospitalar. A baixa prevalência de resistência ao oseltamivir e zanamivir, observada nos vírus da gripe circulantes na população humana, não exclui a possibilidade de uma rápida emergência de resistência e, conseqüente, transmissão e propagação destes agentes resistentes na comunidade (3).

Este trabalho é o mais recente estudo retrospectivo sobre a resistência do vírus da gripe aos antivirais, conduzido no âmbito do Progra-

ma Nacional de Vigilância da Gripe, depois da pandemia de 2009, e reúne a informação de um elevado número de estirpes do vírus da gripe, detetados em doentes da comunidade e hospitalizados, de todo o território nacional e durante as últimas cinco épocas gripais.

Objetivos

Neste trabalho pretendeu-se descrever o perfil de suscetibilidade dos vírus da gripe do tipo A e B aos antivirais inibidores da neuraminidase (NAI), oseltamivir e zanamivir, em doentes com quadro clínico de síndrome gripal (SG) (4), diagnosticados e notificados no âmbito do Programa Nacional de Vigilância da Gripe entre 2009 e 2014.

Material e métodos

As notificações clínicas dos casos SG e as amostras biológicas foram enviadas ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), entre 2009 e 2014, pela Rede de Médicos-Sentinela, Rede de Serviços de Urgência/Obstetria, médicos participantes no projeto EuroEva/I-MOVE e Rede Portuguesa de Laboratórios para o Diagnóstico da Gripe, que integram o Programa Nacional de Vigilância da Gripe.

A deteção do vírus da gripe foi realizada por RT-PCR em tempo real e cultura viral em linha celular MDCK (5). A avaliação da suscetibilidade aos NAI foi realizada no Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e Outros Vírus Respiratórios do Departamento de Doenças Infecciosas do INSA, aplicando métodos de referência que incluem os testes fenotípicos para a determinação do IC₅₀, através do ensaio de inibição da neuraminidase, utilizando um substrato fluorescente, ácido 2'-(4-methylumbelliferyl)-a-D-N-acetylneuraminic, (MUNANA), e testes genotípicos, que incluíram a sequenciação genómica da região codificante do gene da neuraminidase (NA) e a pesquisa da substituição H275Y no gene da NA, no vírus influenza A(H1N1)pdm09, por RT-PCR em tempo real (6).

Resultados

Durante o período do estudo foram avaliadas 357 estirpes dos vírus da gripe (206 influenza A e 151 influenza B) pelo ensaio fenotípico para a determinação da suscetibilidade ao oseltamivir e zanamivir. Foram pesquisadas, em 170 estirpes virais, as substituições associadas à resistência aos NAI (7). Em 643 amostras positivas para o

artigos breves_ n. 2

vírus influenza A(H1)pdm09 foi pesquisada a substituição H275Y, por RT-PCR em tempo real. Os vírus estudados refletem a prevalência do tipo/subtipo em cada inverno. O vírus da gripe A(H1)pdm09 predominou nas épocas de 2009/10, 2010/11 e 2013/14, o vírus A(H3) predominou em 2011/12 e o vírus do tipo B circulou em simultâneo com o vírus A(H1)pdm09 em 2010/11 e 2012/13, tendo sido predominante nesta última época.

Os dados da análise fenotípica mostraram diferenças nos valores de IC₅₀ medianos de acordo com o tipo/subtipo e o antiviral analisado (**Gráficos 1, 2 e 3**). Os vírus da gripe do tipo A demonstraram uma maior suscetibilidade aos inibidores da neuraminidase, quando comparados com os vírus do tipo B. Esta diferença foi mais notória relativamente ao oseltamivir.

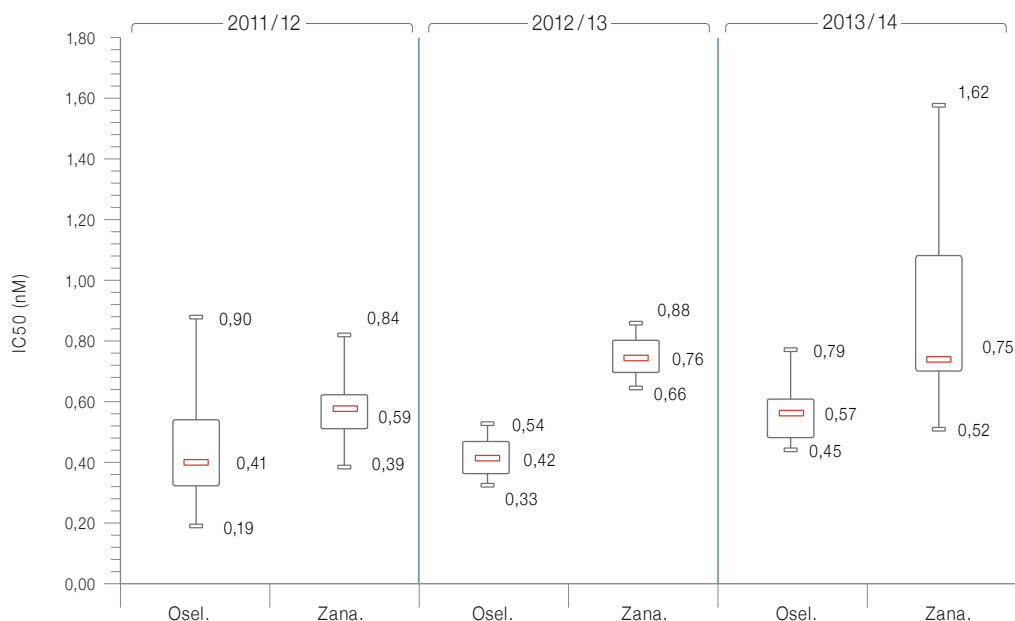
Os vírus A(H3) mostraram uma maior suscetibilidade ao oseltamivir (valores de IC₅₀ entre 0,41 e 0,57nM), quando comparado com o zanamivir (valores de IC₅₀ entre 0,59 e 0,76nM) (**Gráfico 1**).

Nos vírus A(H1)pdm09, os valores de IC₅₀ medianos para os dois antivirais em estudo foram muito semelhantes, embora evidenciem

uma suscetibilidade ligeiramente maior ao zanamivir (**Gráfico 2**). Os vírus do tipo B, foram consideravelmente mais suscetíveis ao zanamivir (valores de IC₅₀ entre 2,80 e 6,69 nM) que ao oseltamivir (valores de IC₅₀ entre 15,14 e 30,73 nM). Esta diferença de suscetibilidade para os dois antivirais foi ainda mas evidente quando os valores medianos de IC₅₀ foram analisados por linhagem Victoria/Yamagata. Os vírus da linhagem Victoria apresentaram suscetibilidade ao oseltamivir duas vezes menor, relativamente à linhagem Yamagata, bem evidenciada pelos valores de IC₅₀ na época 2010/2011, quando foi predominante a circulação dos vírus da linhagem Victoria (**Gráfico 3**). Estes resultados sugerem que a linhagem Yamagata apresentou uma maior suscetibilidade ao oseltamivir.

Para o estudo da suscetibilidade aos antivirais ao longo do tempo, foi realizada a análise de acordo com o ano de isolamento da estirpe viral (**Gráficos 1, 2 e 3**). Os resultados mostram uma variação de época para época para cada um dos (sub)tipos, não sendo no entanto visível uma clara tendência para o aumento dos valores de IC₅₀ ao longo do período do estudo. Os testes fenotípicos permitiram, em 2009/2010, a deteção de um vírus A(H1)pdm09 resistente ao oseltamivir, com uma redução de 720 vezes na suscetibilidade

Gráfico 1: Análise dos valores de IC₅₀ (nM) para os vírus da gripe A(H3), por época (2011-2014), obtidos pelo ensaio de inibição da neuraminidase (fluorescência).



A caixa representa os valores entre o primeiro e terceiro quartil.

O valor mediano está indicado pela linha no interior da caixa.

Vírus analisados por época:
n=33 (2011/2012); n=2 (2012/2013);
n=12 (2013/2014).

Osel.= oseltamivir; Zana.= zanamivir.

Gráfico 2: Análise dos valores de IC_{50} (nM) para os vírus da gripe A(H1)pdm09, por época (2009-2014), obtidos pelo ensaio de inibição da neuraminidase (fluorescência).



A caixa representa os valores entre o primeiro e terceiro quartil.

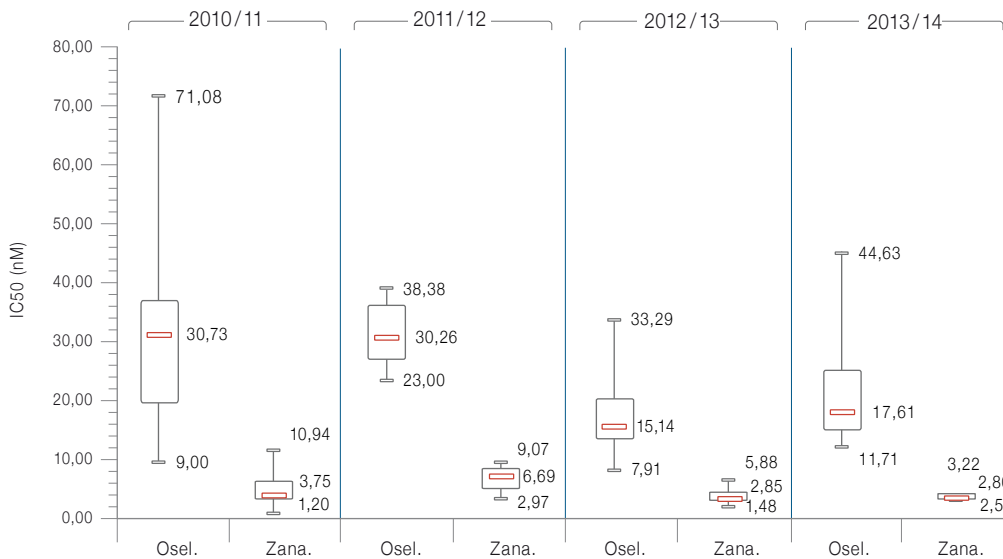
O valor mediano está indicado pela linha no interior da caixa.

Vírus analisados por época: n=25 (2009/2010); n=60 (2012/2013); n=73 (2013/2014).

Osel.= oseltamivir; Zana.= zanamivir.

● =A/Lisboa/171/2009 (H1pdm09) resistente ao oseltamivir.

Gráfico 3: Análise dos valores de IC_{50} (nM) para os vírus da gripe B, por época (2010-2014), obtidos pelo ensaio de inibição da neuraminidase (fluorescência).



A caixa representa os valores entre o primeiro e terceiro quartil.

O valor mediano está indicado pela linha no interior da caixa.

Vírus analisados por época: n=51(osel.)/48(zana.)(2010/2011); n=6 (2011/2012); n=90 (2012/2013); n=4 (2013/2014).

Osel.= oseltamivir; Zana.= zanamivir.

ao oseltamivir ($IC_{50}=502,48$). A este caso estava associada uma história de tratamento anterior com oseltamivir e de doença crónica imunossupressora. Durante a época de 2010/2011 foram identificados mais 2 vírus A(H1)pdm09 resistentes ao oseltamivir, através dos ensaios genotípicos. A um destes casos estava igualmente associado um tratamento prévio com o antiviral, doença crónica imunossupressora e gravidez. Em relação ao outro caso não foi possível obter informação clínica e/ou epidemiológica sobre o mesmo.

A análise da região codificante do gene da NA, realizada em 170 estirpes dos vírus da gripe, incluiu estirpes com valores de IC_{50} *outliers* e *wild type*. Através desta análise foram identificados 2 vírus A(H1)pdm09 com a substituição H275Y, associada à resistência ao oseltamivir. Nenhum dos outros vírus analisados, incluindo os *outliers*, sofreu alguma substituição de aminoácidos relacionada com a redução da suscetibilidade aos antivirais (7). Entre 2009 e 2014 foi pesquisada a mutação H275Y por PCR em 643 vírus A(H1)pdm09. Esta mutação foi detetada em 3 estirpes virais, o que corresponde a 0,5% (3/643) do total dos casos analisados.

_Discussão e conclusão

Face aos resultados obtidos, não se verificaram alterações graduais no perfil de suscetibilidade aos NAI ao longo do período em estudo (2009-2014). Foram detetados 3 vírus do subtipo A(H1)pdm09 resistentes ao oseltamivir, dois dos quais em doentes sob terapêutica antiviral e em situação de imunossupressão. No entanto, não se observou a transmissão de estirpes resistentes aos NAI na comunidade. Os resultados dos ensaios laboratoriais evidenciaram que os vírus da gripe do tipo A [A(H1)pdm09 e A(H3)] apresentam uma maior sensibilidade aos NAI quando comparados com os vírus da gripe do tipo B.

Em conclusão, os resultados da vigilância da suscetibilidade dos vírus da gripe aos NAI mostram que, na sua grande maioria, os vírus em circulação em Portugal são suscetíveis ao oseltamivir e zanamivir. No entanto, e devido à elevada variabilidade dos vírus da gripe, é de grande importância dar continuidade ao estudo da suscetibilidade aos NAI nos atuais e futuros vírus circulantes. Constituinte um dos principais objetivos da vigilância da suscetibilidade aos antivirais para os vírus da gripe, é fundamental con-

tinuar a garantir a utilização e integração da informação dos ensaios fenotípicos e genotípicos, por forma a aumentar a rapidez na deteção de vírus resistentes, a identificar novas mutações associadas à redução da suscetibilidade aos NAI, e permitir a deteção da emergência e transmissão de variantes resistentes aos antivirais.

_Agradecimentos

À Rede de Médicos-Sentinelas, Rede de Serviços de Urgência/Obstetrícia, médicos participantes no projeto EuroEva/I-MOVE e Rede Portuguesa de Laboratórios para o Diagnóstico da Gripe que contribuem para a vigilância da gripe, em Portugal; À Unidade de Tecnologia e Inovação do Departamento de Genética Humana do INSA, pelo serviço de sequenciação genómica prestado; À Carla Roque da Unidade de Culturas Celulares do Departamento de Doenças Infecciosas do INSA; Ao Dr. John McCauley e colaboradores do WHO Collaborating Centre (NIMR, London) por providenciarem os antígenos e os vírus de referência para a caracterização antigénica dos vírus da gripe, isolados em cultura celular no Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e Outros Vírus Respiratórios; À F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland pelo fornecimento do oseltamivir e à GlaxoSmithKline, United Kingdom pela disponibilização do zanamivir.

Referências bibliográficas:

- (1) Monto AS, McKimm-Breschkin JL, Macken C, et al. Detection of Influenza Viruses Resistant to Neuraminidase Inhibitors in Global Surveillance during the First 3 Years of Their Use. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(7):2395-402. [LINK](#)
- (2) Wathen MW, Barro M, Bright RA. Antivirals in seasonal and pandemic influenza-future perspectives. *Influenza Other Respir Viruses.* 2012;7(Suppl1):76-80.
- (3) Barr IG, McCauley J, Cox N, et al ; Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Northern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2009-2010. Epidemiological, antigenic and genetic characteristics of seasonal influenza A(H1N1), A(H3N2) and B influenza viruses: basis for the WHO recommendation on the composition of influenza vaccines for use in the 2009-2010 Northern Hemisphere season. *Vaccine.* 2010;28(5):1156-67.
- (4) European Centre for Disease Prevention and Control. Influenza case definitions [Em linha]. [consult. 11/4/2014]. [LINK](#)
- (5) Public Health England. European collection of cell culture [Em linha]. [consult. 11/4/2014]. [LINK](#)
- (6) WHO Global Influenza Surveillance Network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Geneva: WHO, 2011. [LINK](#)
- (7) International Society for Influenza and other Respiratory Virus Diseases. Amino acid substitutions in the NAs of variants in clinical samples or isolates causing reduced antiviral susceptibility [Em linha]. [consult. 11/4/2014]. [LINK](#)



Tuberculose multirresistente e extensivamente resistente em Portugal, 2008-2013

Rita Macedo, Anabela Santos Silva, Maria João Simões

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

Laboratório Nacional de Referência de Micobactérias, Departamento de Doenças Infecciosas. INSA.

Introdução

A resistência aos antibióticos compromete o controlo e dificulta as estratégias de eliminação da Tuberculose (TB) a nível mundial (1). Doentes infetados por estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes, em particular à isoniazida e rifampicina que, por isso, são designadas por multirresistentes, necessitam de tratamentos mais prolongados, com a toma de um maior número de fármacos e, frequentemente, com inúmeros efeitos adversos.

Na União Europeia (UE/EEE) em 2013, e para os casos novos de TB pulmonar com cultura positiva para *M. tuberculosis*, os resultados de tratamentos com sucesso de uma TB com qualquer tipo de resistência aos antibióticos ficaram abaixo da meta de 85%, estabelecida pelo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) (1,2). Para os casos de TB multirresistente (TB-MR) a taxa de sucesso terapêutico foi de 34% na UE/EEE, substancialmente abaixo da meta imposta de 70% (1,2). Quase dois terços dos doentes, diagnosticados com TB-MR em 2009 na UE/EEE, morreram ou abandonaram o tratamento (2). É sabido que a TB-MR pode resultar de tratamentos incompletos ou inadequados ou de atrasos no diagnóstico da multirresistência. A incapacidade de garantir um tratamento adequado aos casos de TB-MR, não só coloca a vida dos doentes em risco, como também potencia o aparecimento de estirpes extensivamente resistentes (TB-XDR). No período entre 2007 e 2010, 3,4% dos casos novos de TB registados em todo o mundo foram multirresistentes, dos quais apenas 2,6% tiveram confirmação laboratorial por isolamento em cultura. Em relação aos casos de retratamento, 19,8% foram de TB-MR (3).

Em 2013, e de acordo com os dados do Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose (PNT) da Direção-Geral da Saúde (DGS), foram notificados 2292 casos de TB em Portugal, dos quais mais de 80% tinham diagnóstico laboratorial confirmado, por cultura e teste de suscetibilidade a antibióticos (TSA) de primeira linha, cumprindo, assim, os objetivos das metas impostas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pelo ECDC (4,5). Em Portugal, e de acordo com os dados do relatório do PNT da DGS, o número de casos novos de TB-MR está a diminuir e, em 2013, foram notificados 20 (0,87%) casos de TB-MR, dos quais 20% (4 casos) apresentavam critérios de TB-XDR (5). A proporção de TB-MR observada em Portugal é inferior à da média na União Europeia (14%) e encontra-se circunscrita às áreas metropolitanas do Porto e, principalmente, de Lisboa (cerca de 65% dos doentes com TB-MR são residentes na área de Lisboa e Vale do Tejo) (6).

De facto, e conforme consta do relatório de 2013 do PNT, o número de casos confirmados de TB com perfil de suscetibilidade aos antibióticos conhecido tem vindo a diminuir, sendo cada vez mais frequente os doentes iniciarem tratamento com base em critérios clínicos e radiológicos (4). Esta constatação reflete, por si só, a necessidade de se identificarem as causas de cada vez menos doentes terem o isolamento de *M. tuberculosis* em cultura, e consequentemente, não terem resultados da suscetibilidade aos antibióticos, bem como a importância de se avaliar e reativar a rede laboratorial de Vigilância da TB em Portugal (VigLab-Tuberculose). O mesmo relatório aponta também para um decréscimo contínuo do número de casos de TB-MR.

Objectivo

Tendo como finalidade reforçar a importância da vigilância epidemiológica da TB em Portugal, pretende-se com este estudo apresentar os resultados laboratoriais de resistência aos antibióticos, em particular, dos casos multi e extensivamente resistentes entre 2008 e 2013.

Material e Métodos

Para responder ao objetivo proposto, procedeu-se à análise dos resultados laboratoriais das culturas e TSA de primeira e segunda linhas de todos os casos recebidos no Laboratório de Referência de Mico-

artigos breves_ n. 3

bactérias do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), entre 2008-2013, com particular atenção para os casos de tuberculose multirresistente e extensivamente resistente. Neste sentido, constituíram fonte de dados do presente estudo, o Sistema de Vigilância da Tuberculose (SVIG TB) da DGS e o Laboratório Nacional de Referência de Tuberculose do INSA. Para a análise descritiva dos dados recorreu-se ao cálculo de frequências absolutas e relativas.

Resultados

Tuberculose multirresistente

Entre 2008 e 2013 foram recebidas nos Laboratórios de Micobactérias do INSA (Lisboa e Porto) 80 025 amostras biológicas para confirmação de caso clínico suspeito de tuberculose, para monitorização de terapêutica antibacilar ou para testes de identificação e susceptibilidade. Durante o período em estudo, foram realizados 7142 TSA de 1ª linha, em estirpes isoladas de 4169 doentes (Gráfico 1).

Dos 4169 doentes com TB, 306 (7,3%) correspondiam a casos de TB-MR (Tabela 1, Gráfico 2).

Do total das 306 estirpes TB-MR, 145 (47,4%) foram isoladas no INSA e as restantes 161 (52,6%) foram isoladas em laboratórios hospitalares. Os TSA de 1ª linha foram realizados nos laboratórios que fizeram o respectivo isolamento e todos os TSA de 2ª linha foram realizados no INSA (Tabela 2).

Tabela 1: Número de casos TB-MR notificados ao SVIG-TB e número de casos de TB-MR com TSA de 2ª linha realizados no INSA, 2008-2013.

Ano de isolamento	Nº de casos TB-MR notificados ao SVIG-TB	Nº de casos TB-MR com TSA de 2ª linha realizados no INSA
2008	77	69
2009	63	46
2010	53	49
2011	-	54
2012	38	64
2013	20	24
Total	251	306

Tabela 2: Número de casos de TB-MR com indicação do local de realização dos TSA de 1ª e 2ª linhas, 2008-2013.

Ano de isolamento	Nº de casos com TSA de 1ª linha realizado no INSA	Nº de casos com TSA de 1ª linha realizado em laboratório hospitalar	Nº de casos de TB-MR com TSA de 2ª linha realizado no INSA
2008	40	29	69
2009	18	28	46
2010	21	28	49
2011	27	27	54
2012	29	35	64
2013	10	14	24
Total	145	161	306

Gráfico 1: Distribuição dos casos de TB notificados ao SVIG-TB e dos casos de TB com confirmação laboratorial realizada no INSA e respetiva proporção, 2008-2013.

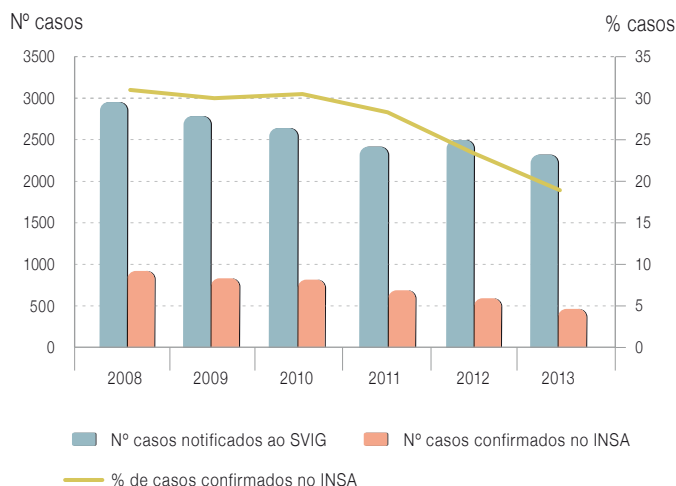
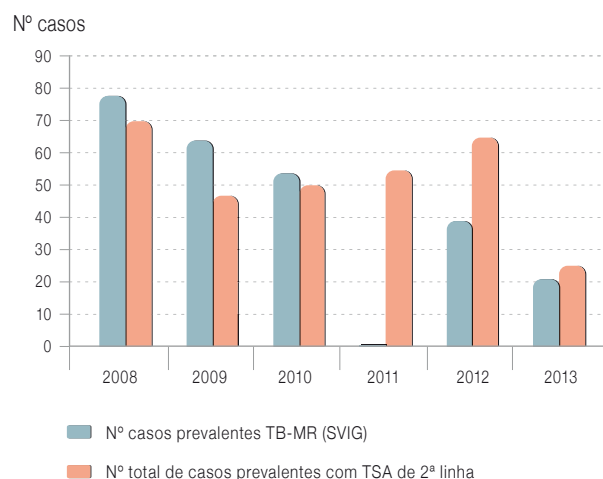


Gráfico 2: Número de casos de TB-MR notificados ao SVIG-TB e número de casos de TB-MR e com TSA de 2ª linha realizados no INSA, 2008-2013.



artigos breves_ n. 3

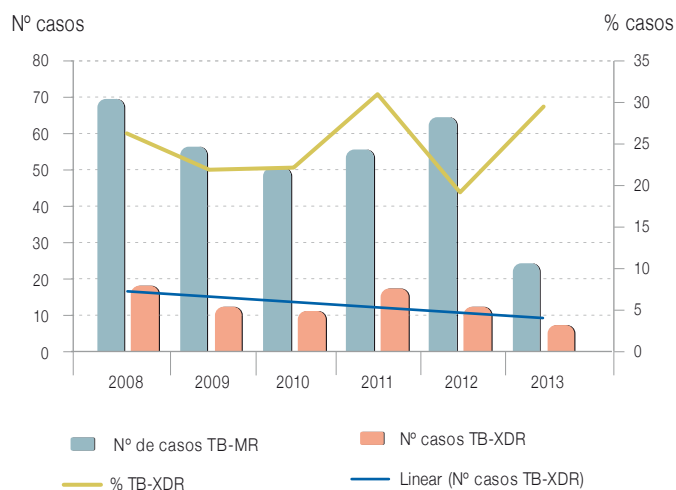
Tuberculose extensivamente resistente

A tuberculose extensivamente resistente (TB-XDR), definida como TB-MR com resistência acrescida aos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, é a forma mais grave de TB. Para o seu tratamento é necessário recorrer a antibióticos com maior risco de toxicidade e, frequentemente, a classes de antibióticos com efetividade ainda não totalmente comprovada. Sendo o INSA o único laboratório a nível nacional a realizar TSA de 2ª linha, pode verificar-se que o número de casos de TB-XDR não tem vindo a decrescer desde 2008, tendo representado 29,2% do total de casos de TB-MR registados em 2013 (Tabela 3; Gráfico 3).

Tabela 3: Número e frequência de casos de TB-XDR com TSA de 2ª linha realizado no INSA, 2008-2013.

Ano	Nº de casos de TB-MR com TSA 2ª linha realizado no INSA	Nº e frequência de casos de TB-XDR (%)
2008	69	18 (26,1%)
2009	46	12 (26,1%)
2010	49	11 (22,4%)
2011	54	17 (31,5%)
2012	64	12 (18,8%)
2013	24	7 (29,2%)
Total	306	77 (25,2%)

Gráfico 3: Número e frequência de casos de TB-MR e número de casos de casos TB-XDR, 2008-2013.



_Discussão e conclusões

Neste estudo, verificou-se que a proporção de casos de TB confirmados no INSA tem vindo a decrescer desde 2008, quando comparado com o número de casos notificados ao SVIG-TB (Gráfico 1). Mantendo-se constante a proporção de casos com confirmação laboratorial (cerca 80%) (4, 5), presume-se que os laboratórios hospitalares têm vindo a aumentar a realização do diagnóstico laboratorial da TB. No entanto, sendo crescente o número de doentes que iniciam tratamento com base apenas em critérios clínicos e radiológicos (4), é necessário compreender as causas da falta de resultados sobre o perfil de suscetibilidade aos antibióticos. Entre outras explicações, como sejam atrasos ou mesmo sub-notificação inerentes ao sistema de vigilância da DGS, pode-se também equacionar a possibilidade dos métodos moleculares de deteção de *M. tuberculosis* e de identificação de mutações associadas à resistência aos antibióticos estarem a ser utilizados como único método de diagnóstico.

Apesar do número decrescente de casos de TB confirmados no INSA (Figura 1), o número de casos de TB-MR identificados tem vindo tendencialmente a aumentar desde 2009 (Figura 2). Contudo, em 2013, observou-se um decréscimo acentuado do número total de casos de TB-MR em Portugal enviados ao INSA para realização de TSA de 2ª linha (Gráfico 2). O número de casos de TB-XDR tem vindo tendencialmente a diminuir, mantendo-se constante a sua proporção relativamente ao total de TB-MR (Gráfico 3).

A falta de cruzamento e validação de alguns dos dados recolhidos das duas fontes em apreciação, nomeadamente o número mais elevado de casos de TB-MR com confirmação laboratorial do que o notificado ao SVIG-TB, e a diminuição do número de casos de TB confirmados no INSA com aumento do número de casos de TB-MR (Tabelas 1 e 2), justificam que a vigilância laboratorial da TB e da resistência aos antibióticos se mantenha uma prioridade. Os métodos moleculares de deteção e caracterização de multirresistência, utilizados por alguns laboratórios como métodos únicos de diagnóstico laboratorial, implicam a existência de redes de laboratórios, que permitam a realização dos testes subsequentes à deteção de ácidos nucleicos, nomeadamente os testes fenotípicos de resistência de 1ª e 2ª linha.

artigos breves_ n. 3

O encerramento de alguns Centros de Diagnóstico Pneumológico e o consequente acompanhamento dos doentes nos hospitais, incluindo o diagnóstico laboratorial, exige uma maior aproximação do laboratório de referência aos laboratórios hospitalares, tendo em vista a uniformização e validação das metodologias laboratoriais adotadas, bem como o reforço da componente laboratorial da vigilância epidemiológica da TB em Portugal.

_Agradecimentos

À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) European Centre for Disease Prevention and Control. Progressing towards TB elimination: a follow-up to the Framework Action Plan to Fight Tuberculosis in the European Union. Stockholm: ECDC; 2010. [LINK](#)
- (2) European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe, 2014. Stockholm: ECDC, 2014. [LINK](#)
- (3) Zignol M, van Gemert W, Falzon D, et al. Surveillance of anti-tuberculosis drug resistance in the world: an updated analysis, 2007-2010. Bull World Health Organ. 2012;90(2):111-9D. [LINK](#)
- (4) Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional de Luta contra a Tuberculose – ponto da situação epidemiológica e de desempenho (dados provisórios), Dia Mundial da Tuberculose 2013. Lisboa: DGS, 2013. [LINK](#)
- (5) Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional de Luta contra a Tuberculose – ponto da situação epidemiológica e de desempenho, Dia Mundial da Tuberculose 2014. Lisboa: DGS, 2014.
- (6) European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2012. Stockholm: ECDC, 2012. [LINK](#)



Infeção invasiva a *Haemophilus influenzae* entre 2002 e 2010: caracterização molecular e padrão de suscetibilidade aos antibióticos

Maria Paula Bajanca-Lavado¹, Alexandra S. Simões²,
Célia Rodrigues Betencourt¹, Raquel Sá-Leão²,
em nome de "The Portuguese Group for the Study of *Haemophilus influenzae* invasive infection"

paula.lavado@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório Nacional de Referência de Infeções Respiratórias a Agentes Bacterianos. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(2) Laboratório de Microbiologia Molecular de Patógenos Humanos. Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa.

Introdução

Haemophilus influenzae pode causar infeções graves, como pneumonia, septicemia e meningite, tanto em crianças como em adultos (1,2). Até à data foram identificados seis tipos capsulares de *Haemophilus influenzae*, classificados de a-f. No entanto, a maior parte das estirpes de *Haemophilus influenzae* isoladas são não-capsuladas (HiNC) (1). *Haemophilus influenzae* serotipo b (Hib) foi a principal causa de elevada morbidade e mortalidade, particularmente em crianças com menos de 5 anos de idade (1). A introdução da vacina conjugada para o Hib na maior parte dos países do mundo levou à diminuição acentuada da incidência da doença neste grupo etário (1). Este facto resultou, contudo, num aumento da incidência da infeção com estirpes não-b, especialmente estirpes HiNC, em todos os grupos etários (1,2). Em Portugal, a vacinação para o Hib, introduzida no Programa Nacional de Vacinação (PNV) em Junho de 2000, foi indicada para todas as crianças em idade pré-escolar (≤ 5 anos de idade), sendo composta por 4 doses, administradas aos 2, 4, 6 e 18 meses de idade (3).

Os antibióticos β -lactâmicos têm sido utilizados no tratamento das infeções por *Haemophilus influenzae*, mas a resistência a esta classe de antibióticos emergiu e disseminou-se por todo o mundo (4). Têm sido descritos dois mecanismos de resistências aos β -lactâmicos: um que envolve a hidrólise enzimática dos β -lactâmicos pelos enzimas TEM-1 ou ROB-1, e outro que envolve a diminuição de afinidade para a proteína de ligação à penicilina (PBP3), devido a mutações no gene *ftsI*, que a codifica (4). Do ponto de vista fenotípico, *Haemophilus influenzae* pode ser de-

signado de acordo com o seu mecanismo de resistência, considerando os "breakpoints" do EUCAST (5), classificando as estirpes como estirpes sensíveis à ampicilina e não produtoras de β -lactamase (BLNAS), estirpes resistentes à ampicilina e não produtoras de β -lactamase (BLNAR) e estirpes resistentes à ampicilina e produtoras de β -lactamase (BLPAR) (6,7).

Objetivo

Este estudo tem como objetivo a caracterização molecular e a determinação da suscetibilidade aos antibióticos de estirpes de *Haemophilus influenzae* isoladas de doentes diagnosticados com infeção invasiva, entre 2002 e 2010, após a introdução da vacina conjugada para o Hib.

Os resultados deste trabalho serão, ainda, discutidos com os obtidos num estudo anterior, relativo a casos com infeção invasiva diagnosticados na era pré-vacinal (1989-2001) (8).

Materiais e métodos

Fonte de dados: O Laboratório Nacional de Referência de Infeções Respiratórias a Agentes Bacterianos (URIR-agentes bacterianos) é o laboratório de referência para o *Haemophilus influenzae*, responsável pela vigilância das infeções invasivas por este agente etiológico. Iniciado em 1989, o sistema de vigilância inclui como fonte de dados, 28 laboratórios hospitalares distribuídos por todas as regiões do país. Entre 1 de janeiro de 2002 e 31 de dezembro de 2010, estes laboratórios isolaram e identificaram estirpes invasivas de *Haemophilus influenzae* e, de forma voluntária, enviaram ao laboratório de referência no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) para posterior caracterização.

Caraterização do serotipo capsular: O DNA foi extraído pelo método de fervura. A caraterização do serotipo capsular foi realizada utilizando os *primers* e as condições descritas por Falla TJ e colaboradores (9).

Determinação da susceptibilidade aos antibióticos: A resistência à ampicilina por produção de β -lactamase foi pesquisada pelo método colorimétrico, utilizando nitrocefina como substrato. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM, mg/L) foi realizada pelo método de microdiluição em placa (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., USA) para 13 antibióticos (ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefaclor, cefuroxima, ceftriaxone,

cefepime, meropenem, cloranfenicol, tetraciclina, rifampicina, trimetoprim/sulfametoxazol, ciprofloxacina e azitromicina). Os valores de "breakpoints" considerados foram os recentemente preconizados pelo EUCAST (5). O antibiótico cefaclor não foi analisado por, ainda, não existirem "breakpoints" estabelecidos pelo EUCAST. Como controlos foram utilizadas as estirpes de referência: ATCC49247 (BLNAR), ATCC10211 (BLNAS) e NCTC11315 (BLPAR).

Determinação genética da resistência à ampicilina: A deteção do gene *bla*_{TEM-1}, que codifica a enzima β-lactamase, foi realizada para todas as estirpes BLPAR, utilizando os *primers* e as condições descritas por Mendonça e colaboradores (10). Alterações nas PBP3 foram investigadas nos isolados não produtores de β-lactamase, com CIM à ampicilina ≥1mg/L, sequenciando a região do gene *ftsI*, como previamente descrito (11). As sequências foram comparadas com as de *Haemophilus influenzae* RD KW20 (nº de acesso NC_000907).

Análise estatística: Para a descrição das características demográficas recorreu-se ao cálculo de frequências absolutas e relativas. Na análise univariada, a intensidade da associação entre variáveis foi estudada aplicando o teste do chi-quadrado. Para todos os testes estatísticos utilizados foi considerado um nível de significância de 5%.

_Resultados

Entre 1 de janeiro de 2002 e 31 de dezembro de 2010 foram recebidas pelo Laboratório de Referência do INSA 144 estirpes isoladas de doentes com infeção invasiva por *Haemophilus influenzae*, que foram enviadas pelos 28 laboratórios hospitalares envolvidos no sistema de vigilância.

Os produtos biológicos das estirpes isoladas foram: sangue (n=109; 75,7%), líquido cefalorraquidiano (LCR) (n=29; 20,1%) e líquido pleural (n=6; 4,2%). Em relação aos 144 doentes, de quem as estirpes de *Haemophilus influenzae* foram isoladas, verificou-se que 59% (85/144) eram do género masculino. Em relação à distribuição etária, 44 (30,6%) doentes pertenciam ao grupo etário ≤5 anos de idade, 15 (10,4%) eram crianças entre os 6 e os 18 anos e 85 (59%) eram adultos com idade superior a 18 anos.

Serotipos capsulares: Do total dos 144 isolados, 111 (77,1%) foram caracterizados como *Haemophilus influenzae* não capsulados e 22,9% como *Haemophilus influenzae* capsulados, sendo 13,2% do serotipo b, 6,9% do serotipo f, 2,1% do serotipo a e 0,7% do sero-

tipo d. A distribuição dos serotipos por ano de isolamento está representada no **Gráfico 1**.

Em 11 crianças, com idade inferior a 18 anos, foi diagnosticada infeção invasiva a Hib. Sete destas crianças pertenciam ao grupo etário ≤ 5 anos. O estado vacinal foi conhecido em seis crianças, cinco das quais estavam a cumprir o PNV.

Suscetibilidade aos antibióticos e produção de β-lactamase: A determinação da suscetibilidade aos antibióticos foi realizada em isolados pertencentes a 142 doentes (**Tabela 1**). A resistência à ampicilina foi encontrada em 20 isolados (14,1%) (15 BLPAR, 5 BLNAR). Observou-se resistência à amoxicilina/ácido clavulânico, cefepime e cefotaxima em 1,4%, 4,2% e 3,5% dos isolados respetivamente. A não suscetibilidade (I+R) à cefuroxima (i.v.) e tetraciclina foi detetada em 16,9% e 2,1% dos isolados respetivamente. Para o trimetoprim-sulfametoxazol, 20,4% dos isolados eram não suscetíveis. Todos os isolados foram suscetíveis ao meropenem, à ciprofloxacina, ao cloranfenicol e à rifampicina e intermédios à azitromicina. Até ao momento não existem *breakpoints* definidos pelo EUCAST (5) para o cefaclor.

Determinantes genéticos da resistência aos β-lactâmicos: Observou-se que todas as 15 estirpes BLPAR isoladas, entre 2002 e 2010, apresentavam o mesmo gene *bla*_{TEM-1}. O gene *ftsI* foi analisado em cinco isolados BLNAR e em sete isolados adicionais, sensíveis à ampicilina, com CIM de 1 mg/L, uma vez que mutações observadas neste gene têm sido associadas a CIMs desta ordem de grandeza (6,12). Onze isolados apresentaram mutações no domínio da transpeptidase, sendo classificados como gBLNAR (**Quadro 1**). As substituições aminoacídicas mais frequentes foram Asn526Lys (10/11; 90,9%) e Asp350Asn (9/11; 81,9%) (6,13). Um isolado com CIM à ampicilina=2mg/L não apresentou mutações no gene *ftsI*.

_Discussão

Em Portugal é escassa a informação sobre a infeção invasiva a *Haemophilus influenzae*. Tendências temporais foram descritas apenas para o período entre 1989 e 2001 (8). Nesse estudo foram apresentadas as alterações ao nível da cápsula e da suscetibilidade aos antibióticos entre as estirpes invasivas obtidas em três períodos, que compreenderam a era pré-vacinal (1989-1993), o período em que a vacina esteve disponível mas não fazia parte do PNV (1994-1999) e os primeiros 18 meses que se seguiram à introdução da vacina no PNV (2000-2001) (8).

artigos breves_ n. 4

No estudo atual, observou-se que durante o período 2002-2010, as estirpes de Hib foram responsáveis por 13,2% (19/144) do total das infeções invasivas identificadas, um valor significativamente mais baixo do que o observado na era pré-vacina (81%, $p < 0,001$) e comparável ao do valor obtido para os primeiros 18 meses que se seguiram à introdução da vacina no PNV (16%, $p = 0,71$) (8). Obser-

vou-se, ainda neste estudo, que o HiNC foi responsável pela maior parte dos casos de infeção invasiva (77,1%; 111/144), um aumento significativo quando comparado com a era pré-vacinal (19,0%, $p < 0,001$), e comparável aos primeiros 18 meses que se seguiram após a inclusão da vacina no PNV (80,0%, $p = 0,75$) (8).

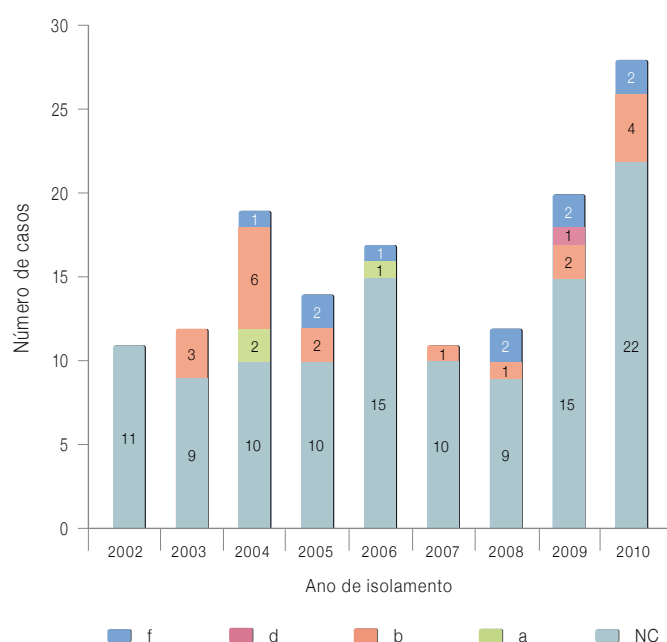
Tabela 1: Suscetibilidade aos antibióticos dos 142 doentes com infeção invasiva a *Haemophilus influenzae*, 2002-2010.

Antibiótico	Padrão de suscetibilidade (%)		
	S	I	R
Ampicilina	85,9	0	14,1
Amoxicilina/ácido clavulânico	98,6	0	1,4
Cefepime	95,8	0	4,2
Cefotaxima	96,5	0	3,5
Cefuroxima (i.v.)	83,1	8,45	8,45
Meropenem	100	0	0
Ciprofloxacina	100	0	0
Azitromicina	0	100	0
Tetraciclina	97,9	0	2,1
Cloranfenicol	100	0	0
Rifampicina	100	0	0
Trimetoprim-sulfametoxazole	79,6	0,7	19,7

S=Sensível; I=Intermédio; R=Resistente

Os "breakpoints" considerados são os preconizados pelo EUCAST (5)
O antibiótico cefaclor não foi analisado por não existir valor de "breakpoints" estabelecido pelo EUCAST (5)

Gráfico 1: Distribuição dos serotipos de 144 doentes com infeção invasiva a *Haemophilus influenzae* por ano de isolamento, 2002-2010.



Quadro 1: Substituições de aminoácidos identificadas no domínio da transpeptidase do gene *ftsI* dos isolados gBLNAR.

Grupo ^a	Nº de isolados não produtores de β -lactamase ^b	Substituições de aminoácidos												
		Próximo do motivo SSN		Próximo do motivo KTG										
		Asp350	Met377	Ala437	Ile449	Gly490	Ala502	Arg517	Asn526	Ala530	Thr532	Val547	Asn569	
I	1	Asn	Ile							His		Ser	Ile	
IIb	1	Asn		Ser	Val						Lys		Ile	Ser
	2	Asn	Ile				Val				Lys		Ile	Ser
	1	Asn	Ile			Glu	Val				Lys		Ile	Ser
	3	Asn				Glu					Lys	Ser		
	1						Val				Lys			
	1	Asn									Lys		Ile	Ser
	1					Glu	Val				Lys		Ile	Ser

^a Grupos e subgrupos definidos de acordo com Ubukata *et al* and Dabernat *et al* (6, 13)

^b Uma das estirpes estudada não apresentava mutações no gene *ftsI*, apesar da CIM de 2 mg/L à ampicilina e à amoxicilina/ácido clavulânico

Noutros países, onde esta vacina foi introduzida, também tem sido descrito um decréscimo significativo da infeção a Hib, em crianças, com um aumento concomitante das infeções invasivas a HiNC (14–17).

Os resultados obtidos no trabalho que agora se apresenta sugerem a emergência de serotipos não-b, uma vez que no período pré-vacinal é conhecido um único caso de doença invasiva por serotipo não b (uma estirpe do serotipo f, isolada em 2001) (8). Neste estudo foram caracterizadas estirpes dos serotipos f (n=10), a (n=3) e d (n=1). Estirpes de serotipo f têm sido igualmente responsáveis por infeção invasiva noutros países europeus (18–20). Em 2009, isolou-se e caracterizou-se em Portugal uma estirpe de serotipo d, responsável por uma meningite numa criança de 5 meses, tendo sido o primeiro caso declarado na Europa (21). Este serotipo, descrito como um serotipo que não provoca infeção, é raro e está normalmente associado a adolescentes e adultos (22).

No decorrer do estudo foram diagnosticadas 5 crianças, entre os 6 meses e os 2 anos de idade, com infeção invasiva a Hib. Estas crianças estavam a cumprir o PNV, tendo uma delas completado o ciclo de vacinação e às outras terem já sido administradas entre duas e três doses da vacina para o Hib. Este facto, alerta para a possibilidade de falências vacinais, de acordo com a definição (23), que merecem atenção das entidades competentes, bem como estudos complementares sobre o estado imunitário das crianças em causa (23).

A resistência aos antibióticos é uma questão preocupante, especialmente com o aumento da deteção, em todo o mundo, de estirpes BLNAR (24–27). A deteção deste fenótipo é clinicamente relevante, uma vez que estas estirpes têm uma resposta diminuta aos antibióticos β -lactâmicos e, simultaneamente, não são alvo do ácido clavulânico. Em Portugal, este fenótipo de resistência tem sido descrito desde 1992 estando normalmente associada com infeções respiratórias (28, 29).

Neste estudo foram identificadas 11 estirpes gBLNAR (CIM à ampicilina de 1-2 mg/L), todas com mutações associadas à resistência à ampicilina, no gene *ftsI* (6, 13). Apesar de as estirpes com uma CIM à ampicilina de 1 mg/L serem consideradas sensíveis pelo EUCAST (5, 30, 31), os resultados obtidos estão de acordo com os de outros estudos que têm detetado mutações no gene *ftsI* destas estirpes, resultando em substituições de aminoácidos nas PBP3, que são responsáveis pela diminuição de suscetibilidade à ampicilina (6, 12, 13, 32).

A produção de β -lactamase foi observada em 10,4% (15/144) dos isolados obtidos dos doentes com infeção invasiva a *Haemophilus influenzae*, um valor mais baixo do que o observado no estudo anterior (26,9%, $p=0,05$) (8).

Apesar de a frequência das estirpes BLPAR ser muito diferente nos dois estudos em comparação, este facto não contribuiu para as diferenças nas resistências obtidas: no estudo prévio, a produção de β -lactamase foi observada em 31,9% e 19,6% das estirpes b e HiNC, respetivamente; no presente estudo observou-se 5,3% e 12,6%, respetivamente para Hib e HiNC. Apesar da frequência elevada de estirpes produtoras de β -lactamase, descrita no Japão (31), na Europa e nos Estados Unidos, tem-se assistido a uma diminuição da frequência de estirpes com esse mecanismo de resistência (24,34).

Relativamente a outros antibióticos, é de assinalar o decréscimo da resistência à tetraciclina (16,0% vs 2,1%) e ao cloranfenicol (10,1% vs 0%). Estes resultados podem ser atribuídos à diminuição do serotipo b, uma vez que estas estirpes estavam associadas a este fenótipo de resistência.

Conclusão

Apesar das limitações deste estudo, relacionadas com a representatividade dos sistemas de vigilância de base laboratorial, pretendeu-se, no entanto, caracterizar a infeção invasiva a *Haemophilus influenzae* em doentes, cujas estirpes foram enviadas ao INSA. De qualquer modo, foram recebidos isolados de 28 hospitais de todo o país, pelo que os resultados obtidos, entre 2002 e 2010, podem fortemente refletir o perfil epidemiológico da infeção invasiva a *Haemophilus influenzae* em Portugal.

Os resultados deste estudo mostram que a implementação da vacina para o Hib no PNV resultou numa redução efetiva do número de casos de Hib que causam doença invasiva. Igualmente, constatou-se uma diminuição acentuada no padrão de resistência aos antibióticos, em particular à ampicilina, e verificou-se que a maior parte dos casos de doença invasiva a *Haemophilus influenzae*, que ocorreram em Portugal durante este período, são agora devidos a estirpes HiNC susceptíveis.

Em conclusão, este estudo demonstra, só por si, a importância de se avaliar os sistemas nacionais de vigilância atualmente existentes e de se articular a componente clínica, laboratorial e epidemiológica desses mesmos sistemas para, assim, melhor se conhecer e monitorizar a infeção por *Haemophilus influenzae* e por outros agentes infecciosos em Portugal.



_Agradecimentos

Aos membros do "The Portuguese Group for the Study of *Haemophilus influenzae* invasive infection" pelo envio das estirpes de *Haemophilus influenzae*: Centro Hospitalar do Barreiro Montijo, Centro Hospitalar de Coimbra, Centro Hospitalar de Lisboa Central, Centro Hospitalar Lisboa Norte, Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental, Centro Hospitalar do Porto, Centro Hospitalar de S. João, Centro Hospitalar Tâmega e Sousa, Centro Hospitalar Vila Nova de Gaia-Espinho, Hospital de Faro, Hospital Dr. Nélio Mendonça, Funchal, Hospital Espírito Santo, Évora, Hospital Garcia de Orta, Almada, Hospital Infante D. Pedro, Aveiro, Hospital Professor Doutor Fernando da Fonseca, Amadora, Hospital de Santa Luzia, Viana do Castelo, Hospital de São Teotónio, Viseu, Instituto Nacional de Saúde, Porto, Hospital Reynaldo dos Santos, Vila Franca de Xira, Hospital dos SAMS, Lisboa, Hospital de Vila Real; À Doutora Manuela Caniça, Responsável pelo Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde pela colaboração e apoio na coleção de estirpes de *Haemophilus influenzae*; À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Watt JP, Wolfson LJ, O'Brien KL, et al. Burden of disease caused by *Haemophilus influenzae* type b in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*. 2009;374(9693):903-11.
- (2) Rubach MP, Bender JM, Mottice S, et al. Increasing incidence of invasive *Haemophilus influenzae* disease in adults, Utah, USA. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(9):1645-50. [LINK](#)
- (3) Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional de Vacinação 2006. Ed. ver. Lisboa: DGS, 2005. (Orientações técnicas; 10), p.18. [LINK](#)
- (4) Tristram S, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(2):368-89. [LINK](#)
- (5) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. V. 4.0, 2014 (válida desde 1/1/2014). [LINK](#)
- (6) Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, et al. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with beta-lactam resistance in beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(6):1693-9. [LINK](#)
- (7) Hasegawa K, Yamamoto K, Chiba N, et al. Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. *Microb Drug Resist*. 2003;9(1):39-46.
- (8) Bajanca P, Canica M. Emergence of nonencapsulated and encapsulated non-b-type invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Portugal (1989-2001). *J Clin Microbiol*. 2004;42(2):807-10. [LINK](#)
- (9) Falla TJ, Crook DW, Brophy LN, et al. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol*. 1994; 32(10):2382-6. [LINK](#)
- (10) Mendonca N, Ferreira E, Canica M. Occurrence of a novel SHV-type enzyme (SHV-55) among isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Portuguese origin in a comparison study for extended-spectrum beta-lactamase-producing evaluation. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006;56(4):415-20
- (11) Cerquetti M, Giufre M, Cardines R, et al. First characterization of heterogeneous resistance to imipenem in invasive nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(9):3155-61. [LINK](#)
- (12) Barbosa AR, Giufre M, Cerquetti M, et al. Polymorphism in *ftsI* gene and beta-lactam susceptibility in Portuguese *Haemophilus influenzae* strains: clonal dissemination of beta-lactamase-positive isolates with decreased susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(4):788-96. [LINK](#)
- (13) Dabernat H, Delmas C, Seguy M, et al. Diversity of beta-lactam resistance-conferring amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(7):2208-18. [LINK](#)
- (14) Livorsi DJ, Macneil JR, Cohn AC, et al. Invasive *Haemophilus influenzae* in the United States, 1999-2008: epidemiology and outcomes. *J Infect*. 2012;65(6):496-504.
- (15) Ulanova M, Tsang RS. Invasive *Haemophilus influenzae* disease: changing epidemiology and host-parasite interactions in the 21st century. *Infect Genet Evol*. 2009;9(4):594-605.
- (16) Giufre M, Cardines R, Caporali MG, et al. Ten years of Hib vaccination in Italy: prevalence of non-encapsulated *Haemophilus influenzae* among invasive isolates and the possible impact on antibiotic resistance. *Vaccine*. 2011;29(22):3857-62.
- (17) Kastrin T, Paragi M, Kolman J, et al. Characterisation of invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Slovenia, 1993-2008. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29(6):661-8.
- (18) Ladhani SN, Collins S, Vickers A, et al. Invasive *Haemophilus influenzae* serotype e and f disease, England and Wales. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(5):725-32. [LINK](#)
- (19) Campos J, Hernando M, Roman F, et al.; Group of Invasive *Haemophilus* Infections of the Autonomous Community of Madrid, Spain. Analysis of invasive *Haemophilus influenzae* infections after extensive vaccination against *H. influenzae* type b. *J Clin Microbiol*. 2014;42(2):524-9. [LINK](#)
- (20) Bruun B, Gahrn-Hansen B, Westh H, et al. Clonal relationship of recent invasive *Haemophilus influenzae* serotype f isolates from Denmark and the United States. *J Med Microbiol*. 2004;53(Pt 11):1161-5. [LINK](#)
- (21) Calado R, Betencourt C, Goncalves H, et al. Complicated meningitis caused by a rare serotype of *Haemophilus influenzae* in Portugal. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;69(1):111-3.
- (22) Ladhani S, Slack MP, Heath PT, et al. Invasive *Haemophilus influenzae* Disease, Europe, 1996-2006. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(3):455-63. [LINK](#)
- (23) Ladhani S, Heath PT, Ramsay ME, et al. Long term immunological follow-up of children with *Haemophilus influenzae* serotype b vaccine failure in the United Kingdom. *Clin Infect Dis*. 2009;49(3):372-80. [LINK](#)
- (24) Garcia-Cobos S, Campos J, Cercenado E, et al. Antibiotic resistance in *Haemophilus influenzae* decreased, except for beta-lactamase-negative amoxicillin-resistant isolates, in parallel with community antibiotic consumption in Spain from 1997 to 2007. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(8):2760-66. [LINK](#)
- (25) Resman F, Ristovski M, Forsgren A, et al. Increase of beta-lactam-resistant invasive *Haemophilus influenzae* in Sweden, 1997 to 2010. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(8):4408-15. [LINK](#)
- (26) Shuel ML, Tsang RS. Canadian beta-lactamase-negative *Haemophilus influenzae* isolates showing decreased susceptibility toward ampicillin have significant penicillin binding protein 3 mutations. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;4(4):379-83.
- (27) Hotomi M, Fujihara K, Billal DS, et al. Genetic characteristics and clonal dissemination of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains isolated from the upper respiratory tract of patients in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(11):3969-76. [LINK](#)
- (28) Melo-Cristino J, Fernandes ML, Serrano N. A multicenter study of the antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Moraxella catarrhalis* isolated from patients with community-acquired lower respiratory tract infections in 1999 in Portugal. *Microb Drug Resist*. 2001;7(1):33-8.
- (29) Bajanca-Lavado MP, Casin I, Vaz Pato MV. Antimicrobial resistance and epidemiological study of *Haemophilus influenzae* strains isolated in Portugal. The Multicentre Study Group. *J Antimicrob Chemother*. 1996;38(4):615-25.
- (30) Garcia-Cobos S, Arroyo M, Perez-Vazquez M, et al. Evaluation of the EUCAST disc diffusion susceptibility testing method for *Haemophilus influenzae* based on the resistance mechanism to beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 2012;68(1):159-63.
- (31) Sondergaard A, Petersen MT, Fuursted K, et al. Detection of N526K-substituted penicillin-binding protein 3 conferring low-level mutational resistance to beta-lactam antibiotics in *Haemophilus influenzae* by disc diffusion testing on Mueller-Hinton agar according to EUCAST guidelines. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(6):1401-4.
- (32) Garcia-de-Lomas J, Lerma M, Cebrian L, et al. Influence of *Haemophilus influenzae* beta-lactamase production and/or *ftsI* gene mutations on in vitro activity of and susceptibility rates to aminopenicillins and second- and third-generation cephalosporins. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;30(2):190-2.
- (33) Ubukata K, Chiba N, Morozumi M, et al. Longitudinal surveillance of *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric patients with meningitis throughout Japan, 2000-2011. *J Infect Chemother*. 2013;19(1):34-41.
- (34) Heilmann KP, Rice CL, Miller AL, et al. Decreasing prevalence of beta-lactamase production among respiratory tract isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(6):2561-4. [LINK](#)



Triquinelose humana: estudo observacional em dois grupos populacionais expostos à infeção por *Trichinella* sp

Idalina Ferreira¹, Susana Martins¹, Tânia Reis¹,
Anabela Vilares¹, Alexandra Mendes², Susana Cardoso²,
Maria do Céu Costa², Maria João Gargaté¹

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

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

(2) Escola Superior de Saúde Ribeiro Sanches, Grupo Lusófona, Lisboa.

Introdução

A Triquinelose é uma doença zoonótica parasitária causada por um nemátodo pertencente ao género *Trichinella*. O parasita foi identificado pela primeira vez ao microscópio por Paget e Owen em 1835, mas há indícios de as suas larvas já terem sido observadas numa múmia do Egito (1). Várias espécies de mamíferos, assim como pássaros e crocodilos, constituem o reservatório do parasita em todo o mundo, mas o ciclo silvático é principalmente mantido por carnívoros selvagens (2). São conhecidas 8 espécies e 10 genótipos deste parasita, a saber, *Trichinella spiralis*, *Trichinella pseudospiralis*, *Trichinella nativa*, *Trichinella nelsoni*, *Trichinella britovi*, *Trichinella murrelli*, *Trichinella papuae*, *Trichinella zimbaboensis*. Todas as espécies, à exceção da *Trichinella zimbaboensis*, infetam os humanos (2).

Trichinella sp infeta o homem através da ingestão de carne crua ou mal cozinhada, parasitada com larvas enquistadas viáveis do nemátodo. O ciclo biológico é constituído por duas fases distintas, uma fase intestinal e uma fase muscular, resultante da migração das larvas através do sistema sanguíneo e linfático para os músculos estriados, onde enquistam e completam o seu crescimento ao vigésimo dia após entrada no tecido muscular (3). São conhecidos casos em humanos de larvas enquistadas durante 17 e 30 anos após infeção (4). O período de incubação e os sintomas clínicos da infeção estão relacionados com a espécie de *Trichinella* envolvida, com o número de larvas viáveis ingeridas e também com a idade, género e estado imunitário do hospedeiro (5). As manifestações clínicas da fase entérica da infeção correspondem a um quadro gas-

trentestinal caracterizado por náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia, sendo a fase parentérica caracterizada por febre, eosinofilia, aumento das enzimas musculares, erupção cutânea, edema periorbital e palpebral e mialgias. As formas mais graves ou fatais da doença devem-se a complicações cardíacas ou neurológicas (6). O diagnóstico laboratorial da triquinelose é efetuado por observação microscópica de amostras de músculo extraídas por biópsia identificando a larva enquistada, ou por métodos serológicos tais como, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), método de rastreio de referência, e Immunoblot (IB), método confirmatório (1, 2).

Esta infeção pode ser evitada cozinhando bem a carne de porco e seus derivados, bem como as carnes de outros carnívoros. As larvas também podem ser eliminadas por congelação a -15°C durante três semanas ou a -20°C durante um dia (1, 2). O tratamento para os humanos inclui a administração oral de mebendazol e tiazibendazol. Certos corticosteróides podem ser utilizados para reduzir as inflamações cardíacas e neurológicas.

São os suínos (porcos e javalis) que constituem o grupo de hospedeiros com maior importância para a transmissão ao Homem, seguidos dos equídeos, e outros mamíferos com interesse cinegético, que também fazem parte da dieta humana.

Estima-se que, pelo menos, 11 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infetadas por *Trichinella* sp (7) e vários surtos com diferentes quadros epidemiológicos continuam a ser notificados na União Europeia (8). Entre 1966 e 1999 foram conhecidos 36 surtos de triquinelose na União Europeia, 20 dos quais ocorreram na última década, maioritariamente em Espanha, devido ao consumo de carne de porco e de carne de javali (9). Estes surtos envolveram vários milhares de pessoas e foram relacionados com três fontes de infeção distintas: o consumo de carne de cavalo importada, que deu origem a surtos urbanos, em que mais de 3300 casos foram notificados em França e Itália nos últimos 25 anos; a ingestão de carne de caça de javali, originando surtos ocorridos em caçadores e seus familiares e a ingestão de carne de porco proveniente de animais criados em propriedade privada. Em 2011 foram notificados, por 7 estados membros da União Europeia, 17 surtos desta parasitose, em que 5 estavam relacionados com o consumo de carne de porco e de javali e/ou seus derivados. De facto, esta tem sido a maior fonte de transmissão da triquinelose

humana na União Europeia, devido à criação de porcos em ambiente privado, não sujeitos a inspeção sanitária e constituindo, assim, um risco de infeção (10).

Em Portugal, o primeiro surto registou-se no Sabugal em 1881 e o último surto foi descrito na região de Penamacor em 1951 (11). Em 1966, foi descrito o último caso autóctone em Alcobaca, resultante do consumo de produtos de salsicharia tradicional de Montalegre (4). A triquinose humana é uma Doença de Declaração Obrigatória no nosso país.

_Objectivo

Este estudo tem como objetivo conhecer a presença de anticorpos anti-*Trichinella* sp em dois grupos populacionais expostos ao consumo de carne e seus derivados sem qualquer inspeção sanitária, durante o ano de 2010.

_Material e Método

Desenho e população em estudo: Foi utilizado um modelo de estudo observacional, transversal que decorreu entre janeiro e dezembro de 2010 no Laboratório de Infeções Parasitárias e Fúngicas Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). A população em estudo inclui dois grupos de indivíduos, ambos expostos ao consumo de carne e derivados sem controlo sanitário e, consequentemente com risco acrescido de adquirir triquinose. O primeiro grupo (grupo A) foi constituído por indivíduos residentes nos distritos de Évora e de Elvas, que habitavam em zonas onde existiam javalis e porcos criados a monte, em que estudos anteriores mostraram possuírem anticorpos anti-*Trichinella*. (5) O segundo grupo (grupo B) foi constituído por caçadores e seus familiares, que tinham como prática alimentar a ingestão de carne de caça, tendo sido selecionados apenas os indivíduos que consumiam carne de javali e/ou raposa.

Instrumento de notação e análise estatística: As duas populações foram convidadas a participar no estudo, através de uma carta informativa sobre a doença. Aos indivíduos que voluntariamente aceitaram, foi colhida uma amostra de sangue nos Hospitais do Espírito Santo de Évora e de Santa Luzia de Elvas (grupo A) e nas várias associações de caça a que pertenciam os caçadores (grupo B). Estas amostras foram enviadas ao INSA para posterior análise laborato-

rial, acompanhadas do consentimento informado e do inquérito epidemiológico, desenhado para o efeito, com dados sobre as características sócio-demográficas e os hábitos alimentares dos indivíduos das duas populações alvo. Para a análise descritiva dos dados recorreu-se ao cálculo de frequências absolutas e relativas.

Diagnóstico laboratorial: As amostras biológicas foram analisadas pelo método qualitativo para a deteção de anticorpos IgG para *Trichinella* sp., através da técnica Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA-IVD Research Inc). A confirmação dos resultados positivos foi efetuada pelo método Western Blot IgG (LDBIO Diagnostics), ensaio qualitativo direcionado para deteção de anticorpos específicos de *Trichinella spiralis* do tipo IgG no soro humano.

_Resultados

A população do grupo A incluiu 200 indivíduos residentes nos distritos de Évora e Elvas. Com idades compreendidas entre os 17 e os 87 anos, 56,5% (113/200) pertenciam ao género feminino e 43,5% (87/200) ao género masculino. O grupo B foi constituído por 73 indivíduos, dos quais 28 (38,4%) pertenciam ao género feminino e 45 (61,6%) ao género masculino. O intervalo etário deste grupo variou entre os 21 e os 60 anos de idade.

Das 200 amostras biológicas, analisadas no grupo A, 29 (14,5%) foram positivas por ELISA, das quais 8 foram confirmadas por Western Blot, específico para a infeção por *Trichinella spiralis*. Relativamente ao grupo B obtiveram-se 19,2% (14/73) de casos positivos por ELISA, cuja razão por género foi de 1:1. Dos 14 casos positivos, 4 foram confirmados por Western Blot (Tabela 1).

Na globalidade, obteve-se 4,0% (8/200) de casos com anticorpos IgG para *Trichinella spiralis* no grupo A e 5,5% (4/73) no grupo B (Tabela 1).

Tabela 1: Pesquisa de anticorpos IgG para *Trichinella* sp nos Grupos A e B.

	Grupo A	Grupo B
	Nº casos positivos (%)	
ELISA	29 (14,5%)	14 (19,2%)
Western blot (<i>T. spiralis</i>)	8 (4,0%)	4 (5,5%)



Discussão e conclusão

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que 4,4% (12/273) dos casos pertencentes aos grupos A e B apresentaram anticorpos específicos anti *T. spiralis*. Os restantes 31 casos positivos, obtidos apenas por ELISA, referem-se a outra espécie de *Trichinella* ou mesmo a falsos positivos, por reação cruzada com outros agentes como *Ascaris*, *Taenias*, *Strongyloides*, *Toxocara* e *Trichuris trichiura*. Acresce que, e de acordo com estudos anteriores (5, 6), a espécie de *Trichinella* encontrada em animais selváticos foi *Trichinella britovi*. Assim, e como o método confirmatório utilizado neste estudo é específico para *Trichinella spiralis*, possivelmente, alguns dos casos positivos por ELISA, que não foram confirmados por Western Blot, poderão ser *T. britovi*.

Relativamente à população que habitava em zonas onde existiam javalis e porcos criados a monte (grupo A), os dados obtidos permitem suspeitar da existência de uma associação entre a doença e o consumo de carne e seus derivados que não foram sujeitos a inspeção sanitária. Em relação à população de caçadores e seus familiares (grupo B), pode-se inferir a mesma hipótese de associação. Por outro lado, e tendo em conta o inquérito realizado sobre os seus hábitos alimentares (12), constou-se que este último grupo não está devidamente informado de como deverá consumir a carne de caça não inspecionada, especificamente, javali e raposa, por forma a levar à eliminação das larvas de *Trichinella* spp.

Tendo em consideração que esta infeção é uma doença de declaração obrigatória e não existindo qualquer declaração desta parasitose desde 1966, este estudo vem comprovar a presença de anticorpos anti-*Trichinella* sp. em Portugal, à semelhança de outros países, nomeadamente Espanha, que tem características epidemiológicas e práticas alimentares semelhantes ao nosso país, sendo, por isso, questionável a não existência desta infeção em Portugal. A não notificação de casos de triquinose humana em Portugal deve-se, provavelmente, ao facto de esta doença apresentar um quadro clínico atípico, facilmente confundido com o quadro de outras patologias, levando, assim, a que esta infeção seja sub-diagnosticada e, consequentemente, sub-notificada no nosso país.

A identificação neste estudo de indivíduos com anticorpos anti-*Trichinella* sp nas duas populações alvo comprova a existência de sub-diagnóstico e determina que a infeção é um potencial problema de Saúde Pública relacionado com a segurança alimentar. Uma vez que não é diagnosticada e/ou apresenta sintomatologia ligeira, esta infeção aumenta o risco de sequelas graves nos indivíduos infectados. Assim, os resultados obtidos vêm comprovar que esta infeção poderá ser considerada, tal como acontece noutros países, nomeadamente Espanha, uma infeção emergente.

Agradecimentos

Aos Hospitais do Espírito Santo de Évora e de Santa Luzia, Elvas e Associações de Caçadores pela colheita das amostras biológicas. À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Despommier D, et al. The *Trichinella* Page [Em linha]. New York: Columbia University [consult.15/11/2007]. [LINK](#)
- (2) Rey, L. Parasitologia, 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- (3) Cook G, Zumla A (ed). Manson's Tropical Diseases. 21ª ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2003.
- (4) Magalhães A, et al. Triquinose: um problema de saúde pública - Fontes de infeção em Portugal. Seminário Infeções por larvas de Helmintas, INSA, Lisboa, 21/4/2005. Comunicação oral.
- (5) Grácio MA, Poiars da Silva J, Fonseca C, et al. Contribuição para o estudo da Triquinose em Portugal: Inquérito epidemiológico em javalis (*Sus scrofa* L.) nas Beiras Litoral e Interior. *Acta Parasitol Port.* 2003;10(1):13-14.
- (6) Magalhães A, Nunes T, Bruno de Sousa, C, et al. Triquinose silvática em Portugal Continental. *Rev Port Cien Vet.* 2004;(Supl 126): 24. [LINK](#)
- (7) Valadas C. Higiene Alimentar: inspeção sanitária de carnes e estudo epidemiológico de toxoplasmose e triquinose em suínos abatidos em matadouros e montarias no Alentejo: Relatório de estágio. Évora, out. 2006.
- (8) Direção-Geral da Saúde. Doenças de Declaração Obrigatória, 1996-2000: região, sub-região, sexo e grupo etário, mês. Lisboa: DGS, 2001. (Estatísticas). [LINK](#)
- (9) Rodríguez de las Parras E, Rodríguez-Ferrer M, Nieto-Martínez J, et al. Trichinellosis outbreaks in Spain (1990-2001). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22(2):70-6.
- (10) European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2013: reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC; 2013. [LINK](#)
- (11) Burmester G, Pezzutto A; Falcato JA (trad). Imunologia - Texto e Atlas. Lisboa: Lidel, 2005.
- (12) Ribeiro A, Leal S. Triquinose em Portugal (trabalho final de investigação aplicada). Lisboa, 2007.



Leishmaniose: confirmação laboratorial de casos clínicos suspeitos de infeção entre 2008 e 2013

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

m.joaogargate@insa.min-saude.pt

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

Introdução

A leishmaniose é uma doença infecciosa causada por um variado número de espécies de um protozoário parasita pertencente ao género *Leishmania*. A transmissão é assegurada quando uma fêmea de diferentes espécies de *Phlebotomus* (Velho mundo) ou *Lutzomyia* (Novo mundo) efetua a sua refeição de sangue num indivíduo. O contágio inter-humano é possível mas raro, podendo ocorrer por transfusões de sangue, partilha de seringas e transmissão materno fetal (1). O cão é o principal reservatório e também o principal hospedeiro deste parasita. O género *Leishmania* inclui aproximadamente 30 espécies, a maioria das quais infeta o Homem originando quatro apresentações clínicas diferentes: leishmaniose visceral (LV) ou síndrome de kala-azar (a forma mais severa da doença), leishmaniose cutânea (LC) (a forma mais comum da doença), leishmaniose cutânea difusa e leishmaniose mucocutânea.

A nível mundial, estima-se que ocorram 1,3 milhões de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes por ano provocados por esta parasitose. Relativamente à forma mais grave da doença (LV) estima-se que surjam entre 0,2 e 0,4 milhões de novos casos por ano em todo o mundo (1). Nos anos 80, esta apresentação clínica de LV assumiu grande importância devido à pandemia VIH/SIDA, atingindo mais de 35% do total de doentes infetados, tornando-se, à data, a terceira doença parasitária oportunista mais frequente da infeção VIH/SIDA, a seguir à toxoplasmose e à criptosporidiose (2). Em Portugal, a leishmaniose é endémica, causada pela espécie *L. infantum*, sendo a apresentação clínica predominante, a leishmaniose visceral. A leishmaniose cutânea é rara em Portugal, e os úl-

timos registos, datados dos anos 40, ocorreram nas bacias hidrográficas dos rios Douro, Tejo e Sado (3).

O diagnóstico laboratorial realizado no INSA pode ser efetuado pela identificação direta das formas amastigotas em esfregaços de sangue ou tecidos normalmente aspirados esplênicos, biópsias hepáticas ou punções medulares, após coloração de Giemsa ou hematoxilina-eosina; pelo isolamento e identificação das formas promastigotas em culturas a 27 °C em meio NNN ou *Schneider's drosophila* a partir de punções medulares e sangues periféricos; por testes imunológicos (IFI, ELISA, Immunoblot), que não deverão ser utilizados no caso de crianças e de doentes imunocomprometidos, que apresentam baixos títulos de anticorpos e, por isso, não é possível distinguir uma infeção ativa de uma infeção antiga. Por último, as técnicas de biologia molecular a partir de sangue periférico ou tecidos, possuem uma elevada sensibilidade e especificidade e permitem identificar rapidamente uma infeção ativa.

Objetivo

Este estudo tem como objetivo descrever as características demográficas de doentes com quadro clínico suspeito de leishmaniose, cujo diagnóstico laboratorial foi confirmado no Laboratório Nacional de Referência de Infeções Parasitárias e Fúngicas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre janeiro de 2008 e dezembro de 2013.

Material e métodos

Foi efetuada a análise retrospectiva dos resultados laboratoriais de todos os casos com suspeita clínica de leishmaniose, que recorreram ao INSA para confirmação ou exclusão do diagnóstico, entre janeiro de 2008 e dezembro de 2013.

Para o diagnóstico laboratorial da infeção por *Leishmania* foram utilizadas métodos serológicos (ELISA (RBioPharma), IFI (Biomerieux), Immunoblot (Ldbio Iberlab)) e o método molecular nested PCR para amplificação da região variável do gene codificante SSUrRNA, adaptado e modificado de Cruz L. *et al* (4). Para a análise descritiva dos dados demográficos dos casos confirmados, recorreu-se ao cálculo de frequências absolutas e relativas.

artigos breves_ n. 6

_Resultados

Entre janeiro de 2008 e dezembro de 2013 foram analisadas, por métodos serológicos e/ou moleculares, amostras biológicas de doentes com suspeita clínica de leishmaniose. Nos casos em que o quadro clínico foi conhecido, 80% apresentavam esplenomegalia. Destas amostras analisadas, confirmaram-se 37 (17,7%) casos positivos: 26 (70%) por métodos serológicos, 10 (27%) por PCR e 1 (3%) por ambas as metodologias.

Na **Tabela 1** apresenta-se o número total de casos com quadro clínico suspeito, recebidos no INSA entre 2008 e 2013, e o número de casos com diagnóstico laboratorial confirmado, por ano de diagnóstico.

Tabela 1: Distribuição dos casos de leishmaniose por ano, 2008-2013.

Ano	Número total de casos analisados	Diagnóstico laboratorial
		Resultado positivo N° (%)
2008	78	14 (17,9)
2009	39	7 (17,9)
2010	37	8 (21,6)
2011	25	2 (8,0)
2012	15	3 (20,0)
2013	15	3 (20,0)
Total	209	37 (17,7)

Em relação à distribuição dos casos positivos por distrito de residência, observou-se que a maioria dos doentes residia no distrito de Castelo Branco (24,3%), seguido do distrito de Setúbal (21,6%) e de Faro (10,8%) (**Gráfico 1**).

Dos doentes cujo género foi conhecido, verificou-se que 58,3% (21/36) pertenciam ao género masculino e 41,7% (15/36) ao género feminino.

A idade foi conhecida em 33 dos 37 doentes com infeção por *Leishmania* sp. Observaram-se 8 casos em crianças: uma criança com 11

meses de idade, cinco com idades compreendidas entre 1 e 4 anos e duas crianças com 14 e 17 anos. Em relação à população adulta, 75,7% (25/33) dos casos ocorreram em doentes com idade igual ou superior a 21 anos, sendo o grupo etário dos 31 aos 50 anos o mais frequente, com 33,3% (11/37) de casos de infeção por *Leishmania* sp. (**Gráfico 2**).

Gráfico 1: Distribuição dos casos de leishmaniose por distrito de residência, 2008-2013.

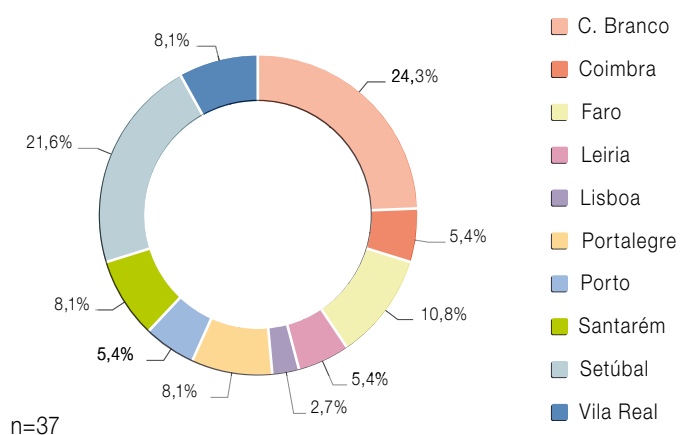
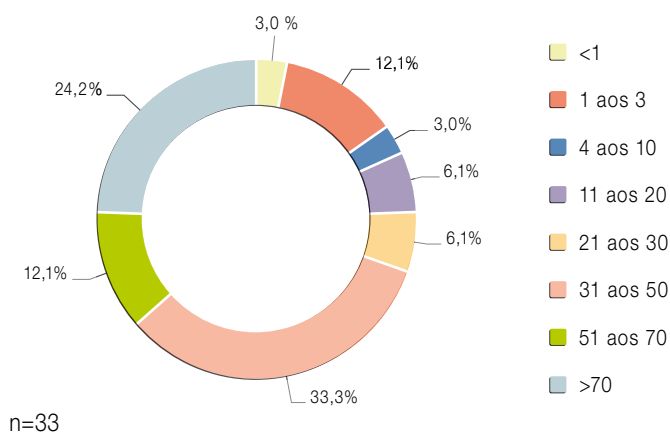


Gráfico 2: Distribuição dos casos de leishmaniose por grupo etário, 2008-2013.



Discussão e conclusão

Entre 2008 e 2013, e segundo o último relatório das Doenças de Declaração Obrigatória 2009-2012 da Direção-Geral da Saúde (DGS), foram notificados 42 casos de leishmaniose (38 confirmados e 4 prováveis), sendo a maioria crianças, entre 1 e 4 anos de idade e do sexo masculino (5). Durante os últimos 6 anos (2008-2013), o Laboratório Nacional de Referência de Infecções Parasitárias e Fúngicas do INSA confirmou 37 casos com suspeita clínica de leishmaniose. Apesar de o Laboratório de Referência do INSA não ser o único, a nível nacional, a efetuar o diagnóstico laboratorial pode-se equacionar a existência de subnotificação desta doença, seguindo o descrito por Serra E., ao concluir que, entre 1999-2009, dos 375 indivíduos internados com Leishmaniose visceral em vários hospitais de Portugal continental, 38,6% foram notificados (6). De acordo com os últimos dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2011 e 2012, não foram declarados casos de leishmaniose em Portugal, tendo sido notificados 88 casos, entre 2005 e 2010 (7). O relatório anual de 2013 do *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) não refere quaisquer dados sobre a ocorrência de leishmaniose nos países europeus, informação esta que vem reforçar a hipótese anteriormente levantada relativamente à subnotificação desta parasitose.

Em relação ao presente estudo, a maioria dos casos ocorreram em indivíduos com idade igual ou superior a 31 anos, o que é corroborado por Campino L. e Ravel, que afirmaram que esta doença deixou de ser considerada predominantemente infantil e passou a emergir na população adulta jovem, em particular nos indivíduos imunocomprometidos com coinfeção VIH/SIDA (8, 9).

A maioria dos casos positivos confirmados neste estudo foi proveniente da Beira Interior (Castelo Branco), seguido da Região de Lisboa e Vale do Tejo (Setúbal e Lisboa) e do Algarve (Faro), o que está de acordo com o estudo realizado por Serrada E., na primeira década de 2000, no que respeita à região de Lisboa e Vale do Tejo (6). Contudo, a urbanização/domesticação dos focos zoonóticos naturais e a diminuição da população canina nas áreas urbanas aumenta a vulnerabilidade do homem à infeção acidental (10).

As alterações climáticas/ambientais e socioeconómicas em Portugal, assim como a resistência do parasita e do vetor aos fármacos e

inseticidas em uso, podem favorecer a emergência e/ou reemergência da leishmaniose no nosso país. Estes factos, associados ao desconhecimento da população sobre a doença e à sua subnotificação, alertam para a importância de se desenvolver um plano nacional de diagnóstico e de prevenção e controlo, quer do vetor, quer da doença humana e canina em Portugal.

Agradecimentos

À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Antunes F (ed). Manual sobre doenças Infecciosas. Lisboa: Permanyer Portugal, 2003, p. 428-30.
- (2) Gargaté MJ. Leishmaniose. In: Nuncio MS, Alves, MJ (eds). Doenças associadas a artrópodes vetores e roedores. Lisboa: INSA, IP, 2014, p. 63-69. [LINK](#)
- (3) Ramo A, Farinhote AA. Contribuição para o conhecimento do kala-azar em Portugal. *Ann Inst Med Trop (Lisb)*. 1952;9(4):1485-1500.
- (4) Cruz I, Cañavate C, Rubio JM, et al. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002;96(Suppl1):S185-9.
- (5) Direção-Geral da saúde. Doenças de Declaração Obrigatória, 2009/2012. Lisboa: DGS, 2014. (Vol. 1). [LINK](#)
- (6) Serrada E. A leishmaniose visceral em Portugal continental (1999-2009), Lisboa: [s.n.], 2010, p. 75-85. Dissertação de mestrado. [LINK](#)
- (7) World Health Organization. Leishmaniasis [Em linha]. Geneva: WHO, 2014. (Fact sheet n°375). [consult. 2/6/2014]. [LINK](#)
- (8) Campino L. Leishmanioses em Portugal: características emergentes da epidemiologia e do diagnóstico. Lisboa: [s.n.], 1998. Tese de doutoramento.
- (9) Ravel C, Cortes S, Pratlong F, et al. First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *Int J Parasitol*. 2006 Nov;36(13):1383-8.
- (10) Abranches P, Pires CA, Conceição-Silva FM, et al. O kala-azar em Portugal: VI Inquérito epidemiológico realizado na região metropolitana de Lisboa: interpretação da estrutura e dinâmica do foco endémico. *J Soc Cienc Med Lisb*. 1987;151:364-79.



Tinea capitis: análise retrospectiva de casos diagnosticados entre 2004 e 2013

Raquel Sabino¹, Helena Parada¹, João Brandão¹,
Cristina Furtado², Soraia Carneiro¹, Cristina Veríssimo¹

cristina.verissimo@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório de Infeções Parasitárias e Fúngicas. Departamento de Doenças Infeciosas, INSA.

(2) Unidade de Referência e Vigilância Epidemiológica. Departamento de Doenças Infeciosas, INSA.

Introdução

A *tinea capitis* é uma infeção do cabelo e do couro cabeludo causada por fungos dermatófitos dos géneros *Trichophyton* e *Microsporum*. As manifestações clínicas podem ser ligeiras, semelhantes à dermatose descamativa não inflamatória, ou mais acentuadas, com lesões inflamatórias e alopecia, podendo evoluir para formas mais graves, tais como as lesões do tipo *Kérion celsi* (1). A transmissão pode ocorrer por via direta, através do contato pessoa a pessoa, ou indiretamente pelo contato com animais infetados.

A *tinea capitis* é considerada um problema de saúde pública sobretudo por ser uma doença de fácil disseminação, mas também devido ao longo período que é necessário para um tratamento efetivo, dando origem a casos frequentes de toxicidade e de interrupção da terapêutica.

A prevalência desta infeção varia consoante o país ou a região, sendo mais prevalente nos países em desenvolvimento, devido principalmente a condições socioeconómicas e de higiene deficitárias (2,3). A *tinea capitis* afeta principalmente crianças em idade escolar (3,5,6). No entanto, a incidência da doença em adultos, em particular na população idosa, tem aumentado nos últimos anos (3,4). De facto, estudos europeus referem alteração do padrão epidemiológico desta infeção (3,5) e também a emergência de espécies raras ou de importação (6).

Em Portugal, estudos realizados na zona norte revelaram *Microsporum canis* como sendo o principal agente da *tinea capitis* (7). No en-

tanto, a região de Lisboa tem apresentado um padrão epidemiológico diferente com prevalência de espécies antropofílicas e de importação (8,9).

Objetivo

Este estudo tem como objetivo descrever o perfil epidemiológico da *tinea capitis*, em doentes da região de Lisboa e Vale do Tejo, cujo diagnóstico laboratorial foi realizado pelo Laboratório de Infeções Parasitárias e Fúngica do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre janeiro de 2004 e dezembro de 2013.

Material e Métodos

Foi realizada uma análise retrospectiva dos resultados laboratoriais, obtidos no período entre 1 de janeiro de 2004 e 31 de dezembro de 2013, de utentes do distrito de Lisboa e Vale do Tejo com suspeita clínica de *tinea capitis*, que recorreram ao Laboratório Nacional de Referência de Infeções Parasitárias e Fúngica do INSA para análise micológica de cabelo e escamas do couro cabeludo. Foram analisados os dados demográficos dos doentes elegíveis para o estudo. Por escassez de dados relativos ao ano 2005, os casos de *tinea capitis* identificados neste ano foram excluídos deste trabalho.

As amostras de cabelo e escamas de couro cabeludo foram analisadas por exame direto com adição de KOH 30% e inoculados em meio de Sabouraud dextrose agar suplementado com cloranfenicol e em agar micobiótico (10,11). A incubação decorreu durante 20-25 dias a 27°C. A identificação dos fungos isolados foi realizada com base em características macroscópicas e microscópicas da colônia, de acordo com atlas de identificação (10,11), complementada por testes adicionais, sempre que necessários.

Resultados

Entre 1 de janeiro de 2004 e 31 de dezembro de 2013, foram identificados 224 casos de *tinea capitis*. Do total de casos diagnosticados, 129 (57,6%) eram do género masculino e 95 (42,1%) do género feminino. Durante o período de estudo, os dermatófitos mais frequentemente isolados foram *Microsporum audouinii* (120 casos; 53,6%), seguidos por *Trichophyton soudanense* (43 casos; 19,2%) (Tabela 1).

artigos breves_ n. 7

Tabela 1: **Dermatófitos isolados de cabelo e escamas do couro cabeludo, 2004-2013***

Dermatófitos isolados	Total	Frequência (%)
<i>Microsporum audouinii</i>	120	53,6
<i>Microsporum canis</i>	23	10,3
<i>Microsporum gypseum</i>	3	1,3
<i>Trichophyton erinacei</i>	2	0,9
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	7	3,1
<i>Trichophyton soudanense</i>	43	19,2
<i>Trichophyton verrucosum</i>	1	0,4
<i>Trichophyton tonsurans</i>	17	7,6
<i>Trichophyton rubrum</i>	4	1,8
<i>Trichophyton violaceum</i>	2	0,9
<i>Trichophyton spp.</i>	2	0,9
TOTAL	224	100

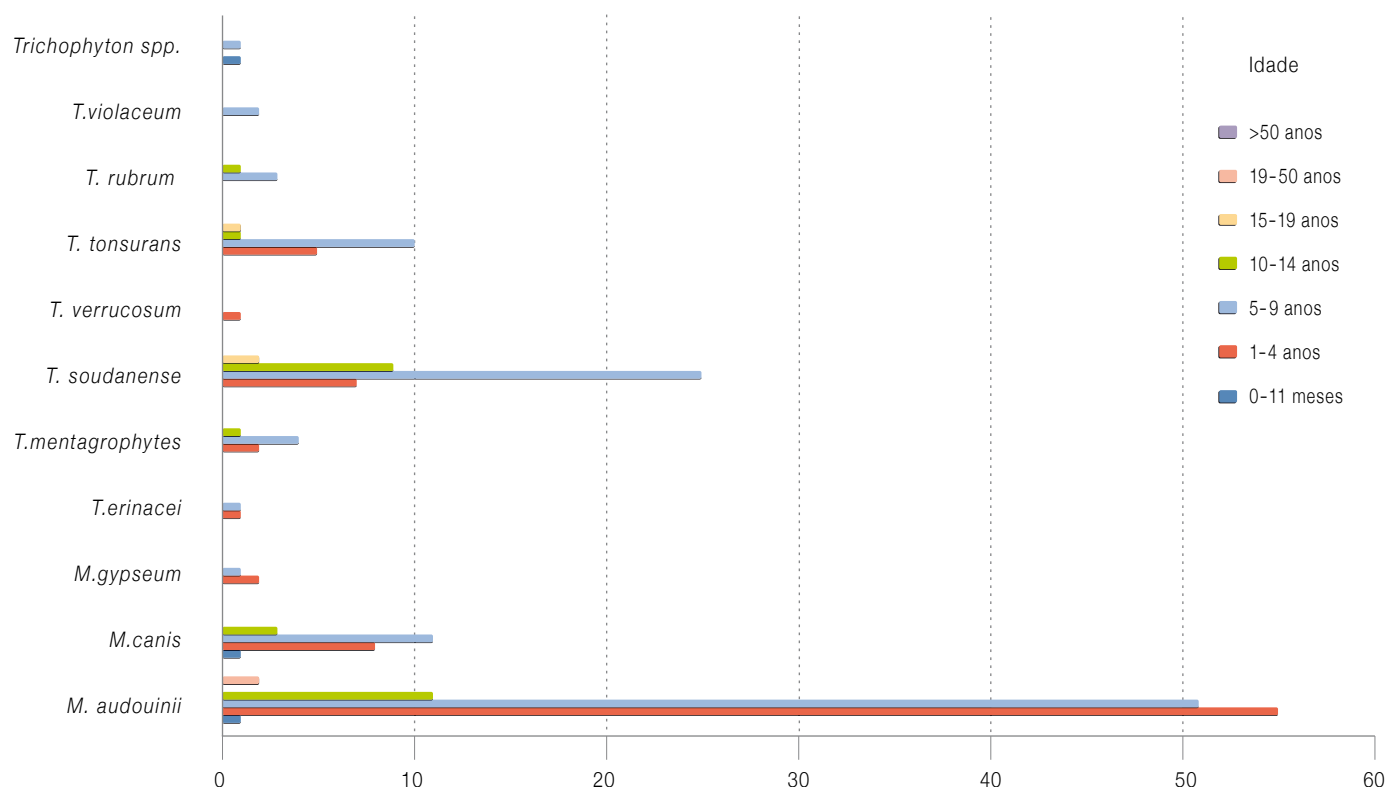
* Excluído ano 2005.

Na distribuição por grupo etário verificou-se que as crianças dos grupos 1-4 anos e 5-9 anos foram as mais afetadas por *tinea capitis* causada por *Microsporum audouinii* (24,5% e 22,7% respetivamente), enquanto *Trichophyton soudanense* foi o segundo agente mais frequentemente isolado nos mesmos grupos etários (3,1% e 11,2% respetivamente) (**Gráfico 1**).

No grupo etário dos 10-14 anos registaram-se 26 (11,6%) casos de *tinea capitis*. Neste grupo etário as infeções por *Microsporum audouinii* representaram 42,3% (11 casos) do total de infeções.

No grupo etário <1 ano foram identificados três casos positivos e nos grupos 14-19 e 20-50 anos foram identificados cinco casos de *tinea capitis* (3 e 2 casos respetivamente). Os casos de *tinea capitis* nestes três grupos etários representam apenas 3,6 % do total de infeções. Não foram observados casos positivos de *tinea capitis* no grupo etário >50 anos durante o período em análise (**Gráfico 1**).

Gráfico 1: **Distribuição de casos de tinea capitis por grupo etário e agente etiológico, 2004-2013***



* Excluído ano 2005.

artigos breves_ n. 7

No período em estudo, a média das frequências das infeções do cabelo e couro cabeludo por *Microsporium audouinii* foi de 51%, tendo-se verificado a frequência mais elevada em 2009 (61,1%). A média das frequências das infeções por *Trichophyton soudanense* foi de 20%, tendo-se registado a frequência mais elevada em 2012 (33,3%). A média das frequências das infeções por *Trichophyton tonsurans* e por *Microsporium canis* foi de 10% e 11% respetivamente, sendo a frequência mais elevada por *Trichophyton tonsurans* em 2004 (33%) e por *Microsporium canis* em 2008 (17,2%). Entre 2008 e 2012 verificou-se um aumento de infeções por fungos antropofílicos, *Microsporium audouinii* e *Trichophyton soudanense*, que diminuíram para valores próximos da média das frequências respetivas a partir de 2012. As infeções por *Microsporium canis* (espécie zoofílica) têm vindo a aumentar desde 2012. (Gráfico 2).

_Discussão e conclusão

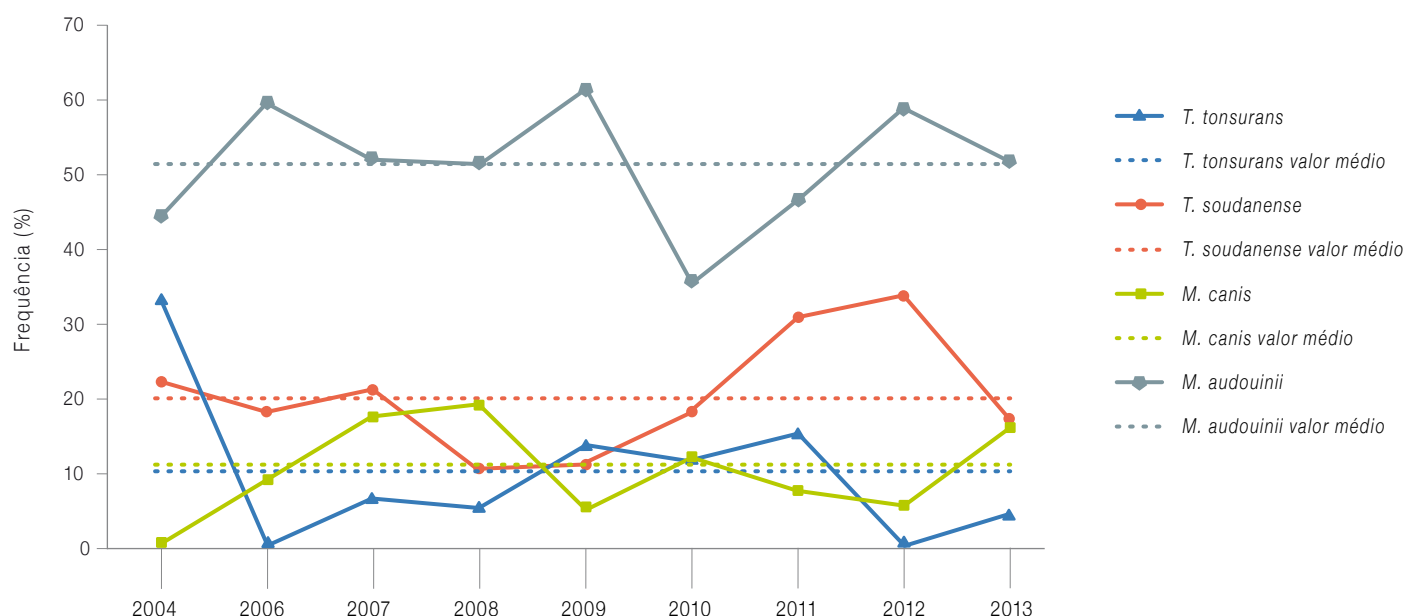
O último estudo europeu sobre as infeções por *tinea capitis* na Europa ocorreu em 1997 (12). Neste estudo observou-se que o número de infeções ectothrix (sem invasão da medula capilar) por *Microsporium canis* permanecia constante na Europa, sendo mais predominante nos espaços rurais. Em contrapartida, as infeções en-

dothrix (com invasão da medula capilar) ocorreram em número cada vez maior em várias partes da Europa, particularmente no Reino Unido, sendo sobretudo infeções por *Trichophyton tonsurans* (12). O mesmo estudo refere ainda que, apesar de *Microsporium canis* ser o principal agente de *tinea capitis*, houve um aumento acentuado de infeções por dermatófitos antropofílicos, particularmente nas zonas urbanas de alguns países europeus. Esta realidade foi igualmente observada noutros estudos (3,11,13).

Relativamente à distribuição regional desta infeção em Portugal, um trabalho realizado nos anos 80 num hospital de Lisboa, refere um aumento da *tinea capitis* por *Microsporium audouinii* (21,7%) e um decréscimo das infeções por *Microsporium canis* (15,3%) (14,15).

No presente estudo observou-se uma maior frequência de *tinea capitis* causada por *Microsporium audouinii*. Esta constatação está de acordo com o padrão epidemiológico observado em trabalhos realizados na região de Lisboa desde 1975 (8), em que se verificou um aumento da frequência de espécies antropofílicas, devido ao fenómeno da imigração de África para esta região do país (9). À semelhança de outros estudos (3,16), observou-se também neste estudo

Gráfico 2: ▾ Variação da frequência de casos de *tinea capitis* por agente etiológico e ano de diagnóstico, 2004-2013*.



* Excluído ano 2005.



artigos breves_ n. 7

uma maior frequência de *tinea capitis* em crianças entre 1 e 9 anos de idade, sendo o género masculino o mais afetado.

Do exposto, saliente-se que o *Microsporum audouinii* é uma espécie exclusivamente antropofílica, bem adaptada ao parasitismo humano, sendo responsável por diversos surtos na população em idade escolar (6). O contágio da *tinea capitis* entre pares é fácil, o seu tratamento é longo, levando muitas vezes ao absentismo escolar. Casos de portadores assintomáticos são frequentes, o que complica o controlo da infeção (17).

Com este estudo pretende-se chamar a atenção de todos os profissionais e autoridades de saúde competentes para a importância da vigilância das infeções por *tinea capitis*, por forma a melhor se conhecer a epidemiologia da doença e rapidamente se poder atuar e prevenir futuros casos de infeção e riscos associados.

Referências bibliográficas:

- (1) Hernández T, Machado S, Carvalho S, et al. Tinhas do Couro Cabeludo na Idade Pediátrica. *Nascer e Crescer* 2004; 13(1):23-6. [LINK](#)
- (2) Hogewoning AA, Adegnik AA, Bouwes Bavinck JN, et al. Prevalence and causative fungal species of tinea capitis among schoolchildren in Gabon. *Mycoses*. 2011;54(5): e354-9.
- (3) Ginter-Hanselmayer G, Weger W, Ilkit M, et al. Epidemiology of tinea capitis in Europe: current state and changing patterns. *Mycoses*. 2007; 50(Suppl2):6-13.
- (4) Fernandes S, Coelho Macias V, Araújo T, et al. Tinea capitis no adulto – um diagnóstico a considerar? *Revista SPDV*. 2012;70 (2):234-7. [LINK](#)
- (5) Hay RJ, Clayton YM, De Silva N, et al. Tinea capitis in south-east London: a new pattern of infection with public health implications. *Br J Dermatol*. 1996; 135(6): 955–8.
- (6) Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. 2008; 51(suppl4): 2-15.
- (7) Valdígem GL, Pereira T, Macedo, C, et al. A twenty-year survey of dermatophytoses in Braga, Portugal. *Int J Dermatol*. 2006;45(7):822-7.
- (8) Rocha M, Rosado L, Cabrita J. Imported dermatophytes in Lisbon. Ringworm of the scalp. *Bull Soc Fr Mycol Med*. 1987; 16(2): 303-6.
- (9) Cabrita J, Esteves J, Sequeira H. Dermatophytes in Portugal (1972-1981). *Mycopathologia*. 1984; 84(2-3): 159-64.
- (10) Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev*. 1995; 8(2): 240-59.
- (11) Romano C. Tinea capitis in Siena, Italy. An 18-year survey. *Mycoses*. 1999; 42 (9-10): 559-62.
- (12) Hay RJ, Robles W, Midgley G, et al.; The European Confederation of Medical Mycology Working Party on Tinea Capitis. Tinea capitis in Europe: new perspective on an old problem. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2001;15(3):229-33.
- (13) Seebacher C, Bouchara JP, Mignon B. Updates on the Epidemiology of Dermatophyte Infections. *Mycopathologia*. 2008;166(5-6):335-52.
- (14) Santos I, Pereira F, Azevedo J, et al. Tinha do couro cabeludo (1973-1983). *Boletim Clínico dos Hospitais Cívicos de Lisboa*. 1985; 41(1-2):83-6.
- (15) Health Protection Agency. Tinea capitis in the United Kingdom: a report on its diagnosis, management and prevention. London: HPA, 2007. [LINK](#)
- (16) Maraki S, Nioti E, Mantadakis E, et al. A 7- year survey of dermatophytoses in Crete, Greece. *Mycoses* 2000; 50 (6): 481-4.
- (17) Patel GA, Schwartz RA. Tinea capitis: still an unsolved problem?. *Mycoses*. 2011; 54(3): 183-8.



Genotipagem de *Candida parapsilosis* com marcadores de DNA microssatélite: uma ferramenta para o estudo e controlo das infeções hospitalares

Raquel Sabino¹, Paula Sampaio², Cristina Veríssimo¹,
Célia Pais²

raquel.sabino@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório de Infeções Parasitárias e Fúngicas. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(2) Centro de Biologia Molecular e Ambiental. Departamento de Biologia, Escola de Ciências, Universidade do Minho.

Introdução

As infeções fúngicas hospitalares constituem atualmente um problema hospitalar relevante em todo o mundo. A fácil transmissão dos fungos pelo ar, pela água ou pelo contato direto ou indireto entre pessoas e com superfícies ou objetos contaminados conduz a uma preocupação crescente com este tipo de infeções em meio hospitalar, principalmente em doentes imunocomprometidos.

Candida parapsilosis é um fungo leveduriforme oportunista causador de infeções sistémicas, principalmente em doentes oncológicos (1), doentes internados em unidades de cuidados intensivos (2) e em recém-nascidos (3). O controlo das infeções nosocomiais por *Candida* requer um conhecimento aprofundado da estirpe infetante e do estado imunológico do doente internado.

Os fungos reproduzem-se por libertação de esporos de pequena dimensão e têm uma elevada dispersão ambiental. São fontes comuns de aquisição de infeções fúngicas em ambiente hospitalar, os sistemas de ventilação e de ar condicionado, a água, poeira, matéria orgânica em decomposição, plantas e flores ornamentais, alimentos, obras de construção no hospital ou nas suas imediações e, até, os próprios doentes, visitantes e profissionais de saúde (4).

O modo de transmissão ocorre por contacto, ingestão ou inalação de partículas contaminadas. O grupo de doentes com risco acrescido de adquirir uma infeção fúngica nosocomial são os doentes transplantados ou oncológicos, bem como os doentes em cuidados intensivos e/ou continuados como os doentes queimados. Os do-

entes oncológicos, principalmente os doentes hematológicos apresentam um maior risco de desenvolvimento de infeções fúngicas invasivas. De facto, cerca de 20 a 50% destes doentes evidenciam sinais de infeção fúngica invasiva aquando da autópsia (5).

Na Europa e América Latina, a *Candida parapsilosis* é uma das espécies predominantemente isoladas da corrente sanguínea (1,6) e têm sido descritos vários surtos hospitalares causados por esta levedura, associados ao uso de cateteres, sondas, ou dispositivos prostéticos contaminados (7,8). Acresce que, e ao contrário de outras espécies de *Candida*, a *Candida parapsilosis* é frequentemente isolada das mãos dos profissionais de saúde (9).

A rápida identificação de estirpes envolvidas na infeção fúngica e o conhecimento da diversidade genética são questões de grande importância clínica, uma vez que podem contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias na prevenção e tratamento das infeções nosocomiais e, conseqüentemente, assegurar a melhoria do estado geral do doente.

Objetivo

Este estudo teve como objetivo desenvolver novas ferramentas moleculares, que permitam responder atempadamente a questões epidemiológicas contribuindo, assim, para a redução do risco de infeções hospitalares por *Candida parapsilosis*.

Material e métodos

Foram desenvolvidos métodos moleculares de genotipagem de DNA microssatélite de estirpes de *Candida parapsilosis* (10). O protocolo desenvolvido foi aplicado a 233 isolados de *Candida parapsilosis*. Estes isolados foram obtidos de 194 produtos biológicos (sangue; secreções do trato respiratório; urina, pele e unhas) de doentes internados e de 39 amostras provenientes do ar, de superfícies hospitalares, de dispositivos médicos e das mãos dos profissionais de saúde.

Na genotipagem foram utilizados quatro marcadores de DNA microssatélite por análise multiplex. O poder discriminatório combinado dos quatro marcadores foi de 0.99, o que significa que este método tem uma precisão de 99% na discriminação de estirpes de *Candida parapsilosis*. Dado o elevado poder discriminatório desta técnica, este método foi posteriormente aplicado ao estudo de casos em ambiente hospitalar, para os quais se procuravam respostas a nível epidemiológico.

Resultados e discussão

Utilizando o método de genotipagem desenvolvido (10), observou-se que em casos de isolados múltiplos do mesmo doente, o genótipo multilocus de estirpes colonizadoras e causadoras de infeção manteve-se, podendo, este facto, indicar que determinado genótipo confere alguma adaptação ao hospedeiro.

Tendo como finalidade a deteção ou exclusão de surtos, bem como a detecção de possíveis fontes de contaminação, foram estudadas as estirpes de *Candida parapsilosis*, isoladas de diferentes doentes, bem como isolados colhidos em vários locais do ambiente hospitalar. Dos resultados obtidos descrevem-se as três investigações seguintes:

Investigação 1

Foram genotipados três isolados de *Candida parapsilosis*, cujas amostras clínicas foram colhidas num intervalo de 2 semanas, a partir de sangue e de urina de três doentes internados no serviço de pediatria de uma unidade hospitalar. Observou-se que os três isolados apresentavam o mesmo perfil genotípico, indicando que se tratava da mesma estirpe ou estirpes muito relacionadas (Tabela 1).

A presença, no mesmo período de tempo e no mesmo serviço hospitalar, da mesma estirpe em três doentes internados sugere a existência de um surto nosocomial. Nenhuma estirpe de *Candida parapsilosis* foi isolada durante este período de colheita em outros serviços deste hospital.

Investigação 2

Foi encontrado o mesmo genótipo ou um genótipo multilocus com um elevado grau de similaridade em estirpes de *Candida parapsilosis*, isoladas de diferentes superfícies do meio ambiente hospitalar, bem como das mãos de um profissional de saúde e, ainda, de um doente internado de um hospital (Tabela 2). O alto grau de similaridade genética entre estes isolados indica uma via de transmissão única da estirpe, provavelmente através do contacto direto com doentes e/ou com superfícies contaminadas.

Os isolados ambientais M, O e P (Tabela 2) foram todos colhidos no mesmo dia, um deles a partir de um carrinho de apoio clínico e os outros dois das maçanetas das portas de um mesmo serviço hospitalar. Os locais de colheita sugerem uma cadeia de transmissão da estirpe de *Candida parapsilosis* por contacto manual. Nenhum dos outros doentes internados no serviço hospitalar em análise apresentou infeções causadas por esta estirpe com um genótipo multilocus igual ou similar no mesmo período de tempo.

No isolado F, cuja amostra foi colhida das mãos de um profissional de saúde, foi identificado o mesmo genótipo, que nos isolados Q e R, colhidos de uma torneira de água e de um carrinho de apoio clínico 3 meses após a colheita do isolado F. Observou-se, ainda, que um doente internado neste mesmo serviço apresentou uma infeção por *Candida parapsilosis* com o mesmo genótipo (isolado C), 5 meses depois da colheita realizada das mãos do profissional de saúde (Tabela 2).

Tabela 1: ↓ Genotipagem de marcadores de DNA microssatélite em isolados clínicos de *Candida parapsilosis* colhidos num serviço de pediatria de um hospital.

Doente #	Sexo	Produto Biológico	Serviço Hospitalar	Genótipo Multilocus			
				CP1	CP4	CP6	B
1	Feminino	Urina	Pediatria	222/243	354/354	282/336	127/127
2	Masculino	Hemocultura	Pediatria	222/243	354/354	282/336	127/127
3	Masculino	Hemocultura	Pediatria	222/243	354/354	282/336	127/127

Tabela 2: Genotipagem por marcadores de DNA microsatélite de *Candida parapsilosis* em isolados ambientais e clínicos colhidos num serviço de hematologia de um hospital.

Identificação do isolado	Origem	Genótipo Multilocus			
		CP1	CP4	CP6	B
M	Maçaneta da porta do quarto de um doente	240/240	342/342	285/285	103/103
O	Maçaneta da porta de instalações sanitárias	240/240	342/342	285/285	103/103
P	Carrinho de apoio clínico	240/240	342/342	285/285	103/103
F	Mãos de profissional de saúde	222/243	354/354	282/336	129/129
Q	Torneira	222/243	354/354	282/336	129/129
R	Carrinho de apoio	222/243	354/354	282/336	129/129
C	Hemocultura	222/243	354/354	282/336	129/129

No que respeita aos resultados obtidos das colheitas feitas nas mãos dos profissionais de saúde hospitalar, *Candida parapsilosis* revelou ser a levedura mais frequentemente isolada. Conforme apresentado na Figura 1, a lavagem e desinfeção das mãos mostrou ser essencial, quer na remoção de leveduras quer de fungos filamentosos.

Investigação 3

Foi realizada a genotipagem em 49 isolados provenientes de diferentes produtos biológicos e do meio ambiente de um hospital. Verificou-se que em cinco destes isolados, (4 hemoculturas e 1 catéter), cujas colheitas foram efetuadas em cinco doentes durante o período de dois anos, partilhavam o mesmo genótipo multilocus (Tabela 3). Durante este período de tempo, não foi detetado este genótipo multilocus em nenhum dos isolados de *Candida parapsilosis* colhidos e analisados noutros serviços deste hospital. Este facto, sugere a presença de uma estirpe residente no hospital em estudo.

Figura 1: Placas de contacto das mãos dos profissionais de saúde hospitalares antes (a) e depois (b) da lavagem e desinfeção das mãos.

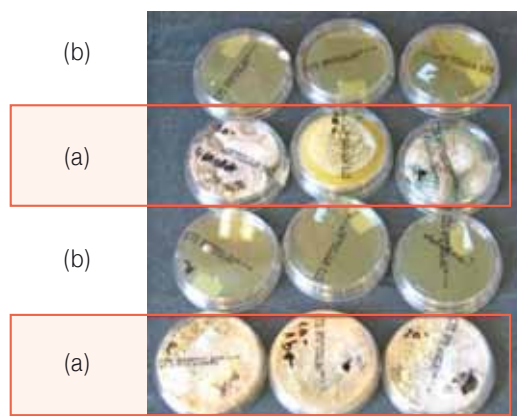


Tabela 3: Genotipagem por marcadores de DNA microsatélite de isolados de *Candida parapsilosis* obtidos de um dispositivo médico e de quatro doentes internados de um hospital.

Doente #	Produto	Genótipo Multilocus			
		CP1	CP4	CP6	B
1	Hemocultura	240/252	300/300	285/285	147/149
2	Hemocultura	240/252	300/300	285/285	147/149
3	Catéter	240/252	300/300	285/285	147/149
4	Hemocultura	240/252	300/300	285/285	149/149
5	Hemocultura	240/252	300/300	285/285	149/149



_Conclusões

Para uma melhor compreensão da epidemiologia de *Candida parapsilosis* em ambiente hospitalar e também em prol da melhoria do estado de saúde do doente internado, vários métodos de tipagem têm sido desenvolvidos. A genotipagem por marcadores de DNA microssatélite mostrou ser uma metodologia altamente discriminatória, podendo assim, ser uma ferramenta valiosa para apoiar as investigações epidemiológicas.

Com este estudo, e assumidas as limitações conceptuais do mesmo, constatou-se que a presença simultânea de casos de infeção por *Candida parapsilosis* no mesmo serviço hospitalar (investigação 1 e 3) e a presença continuada da mesma estirpe de *Candida parapsilosis* nas mãos de um profissional de saúde, num doente internado e em diferentes superfícies (investigação 2), indicam que esta espécie fúngica é um importante veículo de infeção nosocomial, que merece a melhor atenção pelas comissões de controlo de infeção e entidades hospitalares competentes.

O desenvolvimento de marcadores de DNA microssatélite na genotipagem de estirpes de *Candida parapsilosis*, abre a possibilidade de investigações epidemiológicas futuras em meio hospitalar, nomeadamente a identificação atempada de potenciais reservatórios de infeções endógenas e exógenas por *Candida parapsilosis*. Por outro lado, a utilização desta ferramenta molecular alerta também para a adoção de medidas preventivas adequadas, que irão certamente contribuir para a diminuição da incidência das infeções fúngicas nosocomiais, fundamentar ações de sensibilização periódicas para os profissionais hospitalares e, ainda, sustentar uma monitorização sistemática da carga fúngica em ambiente hospitalar.

_Agradecimentos

Os autores agradecem, a todos que colaboraram na obtenção dos dados e produção deste artigo; à Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Almirante B, Rodriguez D, Cuenca-Estrella M, et al. Epidemiology, risk factors and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol.* 2006;44(5):1681-5. [LINK](#)
- (2) Diab-Elschahawi M, Forstner C, Hagen F, et al. Microsatellite genotyping clarified conspicuous accumulation of *Candida parapsilosis* at a cardiothoracic surgery intensive care unit. *J Clin Microbiol.* 2012;50(11):3422-6. [LINK](#)
- (3) Romeo O, Delfino D, Cascio A, et al. Microsatellite-based genotyping of *Candida parapsilosis sensu stricto* isolates reveals dominance and persistence of a particular epidemiological clone among neonatal intensive care unit patients. *Infect Genet Evol.* 2013;13:105-8.
- (4) Kordbacheh P, Zaini F, Ansari K, et al. Study on the sources of nosocomial fungal infections at intensive care unit and transplant wards at a teaching hospital in Tehran. *Iranian J Publ Health.* 2005;34(2):1-8. [LINK](#)
- (5) Traoré O, Springthorpe V, Sattar S. A quantitative study of the survival of two species of *Candida* on porous and non-porous environmental surfaces and hands. *J Appl Microbiol.* 2002;92(3):549-55.
- (6) Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, et al. Candidemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;27(5):359-66.
- (7) Lupetti A, Tavanti A, Davini P, et al. Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol.* 2002;40(7):2363-9. [LINK](#)
- (8) van Asbeck EC, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit Rev Microbiol.* 2009;35(4):283-309.
- (9) Wenzel R, Edmond M. The impact of hospital-acquired bloodstream infections. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(2):174-7. [LINK](#)
- (10) Sabino R, Rosado L, Sampaio P, et al. New polymorphic microsatellite markers able to distinguish among *Candida parapsilosis sensu stricto* isolates. *J Clin Microbiol.* 2010;48(5):1677-82. [LINK](#)



Estudo observacional da infeção por *Campylobacter* spp. em doentes com diarreia aguda

Mónica Oleastro, Andrea Santos, Cláudia Júlio

monica.oleastro@insa.min-saude.pt

Laboratório Nacional de Referência de Infeções Gastrointestinais. Departamento de Doenças Infeciosas, INSA.

Introdução

A infeção por *Campylobacter*, em particular *C. jejuni* e *C. coli*, é a principal causa mundial de infeções bacterianas entéricas. Para além das manifestações gastrointestinais, este agente etiológico é responsável por bacteremias, sobretudo em doentes imunocomprometidos, ou por complicações pós-infeção, como são exemplo a artrite reativa e a síndrome de Guillain-Barré (1, 2). A principal via de transmissão é através do consumo de água ou alimentos contaminados, sobretudo carne de aves, sendo muito rara a transmissão de pessoa a pessoa (3).

Segundo o último relatório do *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), a campilobacteriose é a doença zoonótica mais frequentemente notificada em humanos, com uma incidência de 69,73/100 000 habitantes nos países da União Europeia em 2011, tendo o maior número de casos ocorrido em crianças do género masculino com idade inferior a 5 anos (157,3/100 000 crianças) (4). Em Portugal, os dados de morbilidade da infeção por *Campylobacter* spp. são escassos.

Objetivos

O presente estudo teve como objetivo avaliar a frequência de infeções por *Campylobacter* spp. e identificar potenciais fatores demográficos e clínicos associados em doentes com quadro clínico de diarreia aguda, que recorreram às urgências ou consultas hospitalares, entre setembro e novembro de 2012.

Material e métodos

Foi utilizado um modelo de estudo observacional, transversal, com uma componente analítica. Foram incluídos no estudo todos os

doentes com um quadro clínico de infeção gastrointestinal com diarreia aguda, que se deslocaram a 22 hospitais, distribuídos de norte a sul de Portugal Continental, entre setembro e novembro de 2012. Durante este período, todos os laboratórios hospitalares recolheram e prepararam uma amostra de fezes de cada um dos doentes elegíveis para o estudo. Estas amostras biológicas foram posteriormente enviadas ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), acompanhadas de um questionário, desenhado para o efeito, com dados demográficos e clínicos sobre os doentes.

Os antígenos de *C. jejuni* ou *C. coli* foram detetados por ELISA, com o kit RIDASCREEN® *Campylobacter* (R-Biopharm). Para todas as amostras positivas, foi feita a extração dos ácidos nucleicos (EasyMag, bioMerieux, França) e foi realizado um PCR em tempo-real, com sondas FRET, para identificação da espécie.

Para a análise descritiva recorreu-se ao cálculo de frequências absolutas e relativas. A análise univariada foi efetuada recorrendo ao software IBM SPSS (versão 22). A intensidade de associação entre variáveis foi estudada aplicando o teste do χ^2 ou o teste exato de Fisher, nos casos em que as frequências esperadas foram inferiores ou iguais a 5. Para todos os testes estatísticos utilizados foi considerado um nível de significância de 5%. A intensidade de associação entre variáveis foi calculada pela *Odds ratio* (OR) e respetivos intervalos de confiança.

Resultados

De setembro a novembro de 2012 foram analisadas 576 amostras de fezes diarreicas de doentes com sintomas gastrointestinais agudos, sendo 312 (54,2%) doentes pediátricos (idade \leq 18 anos) e 264 (45,8%) adultos ($>$ 18 anos); 309 (53,6%) doentes pertenciam ao género masculino e 267 (46,4%) ao género feminino.

O diagnóstico laboratorial mostrou que 8,2% (47/576) das amostras foram positivas para antígenos de *Campylobacter*. Verificou-se que dos 47 indivíduos infetados, 82,9% (39/47) eram doentes com idade \leq 18 anos, dos quais cerca de 59% (23/39) pertenciam ao grupo etário 0-4 anos (Tabela 1).

artigos breves_ n. 9

Tabela 1: Distribuição dos 47 doentes positivos para *Campylobacter* spp., por grupo etário.

Grupo Etário (anos)	% (n/N)
0-4 anos	48,9 (23/47)
5-18 anos	34,0 (16/47)
>18 anos	17,0 (8/47)

Quando comparada a distribuição por grupo etário, observou-se que a frequência de doentes infetados com idade ≤ 18 anos foi significativamente mais elevada do que na população adulta (12,5% versus 3,0%; $P < 0,001$; OR=4,6; IC95%:2,0-10,8). Relativamente às características clínicas, verificou-se que a infeção por *Campylobacter* estava significativamente associada à febre (15,5% versus 6,7%, $P = 0,007$; OR=2,6; IC95%: 1,3-4,9) e à diarreia com sangue (29,3% versus 6,5%, $P < 0,001$; OR=5,9; IC95%: 2,8-12,6).

A distribuição ao longo do tempo mostrou que ocorreram menos casos de infeção por *Campylobacter* no mês de outubro (5,7%), do que nos meses de setembro (10,0%) e de novembro (9,6%).

Em relação à distribuição por regiões de saúde, observou-se maior número de casos na região norte (10,3%), seguida das regiões de Lisboa e Vale do Tejo (8,2%), Sul (7,2%) e Centro (3,4%).

Quanto à identificação da espécie por PCR, dois doentes adultos estavam infetados por *C. coli* e os restantes apresentaram infeção por *C. jejuni*.

A Tabela 2 resume as características demográficas e clínicas dos doentes infetados por *C. jejuni* com idade ≤ 18 anos. Na análise univariada observou-se que nenhuma das variáveis demográficas apresentou diferenças estatisticamente significativas, verificando-se, assim, uma

Tabela 2: Características demográficas e clínicas dos doentes infetados por *C. jejuni* com idade ≤ 18 anos.

	n	Resultados Positivos (%)	OR	OR IC95%	P
Género					
Masculino	174	20 (11,5)	0,807	0,412-1,58	0,606
Feminino	138	19 (13,8)			
Idade, anos					
0-4	201	23 (11,4)	0,767	0,387-1,522	0,477
5-18	111	16 (14,4)			
Dor abdominal					
Sim	71	11 (15,5)	1,395	0,656-2,964	0,415
Não	241	28 (11,6)			
Vómitos					
Sim	111	7 (6,3)	0,355	0,151-0,835	0,019
Não	201	32 (15,9)			
Desidratação					
Sim	25	1 (4,0)	0,273	0,036-2,077	0,338
Não	287	38 (13,2)			
Febre					
Sim	64	12 (18,8)	1,889	0,898-3,975	0,073
Não	248	27 (10,9)			
Diarreia com sangue					
Sim	34	11 (32,4)	4,3	1,9-9,7	0,001
Não	278	28 (10,1)			
Diarreia aquosa					
Sim	69	5 (7,2)	0,480	0,180-1,279	0,153
Não	243	39 (14,0)			

uniformidade do género e grupos etários relativamente à infeção por *C. jejuni*. Quanto à apresentação clínica da infeção por *C. jejuni* nas crianças com ≤ 18 anos, e de entre as variáveis analisadas, observou-se uma associação estatisticamente significativa com a variável diarreia com sangue (32,4% versus 10,1%, $P=0,001$; OR=4,3; IC95%: 1,9-9,7) e ausência de vômitos (6,3% versus 15,9%, $P=0,019$; OR=2,8; IC95%: 1,1-7,3).

_Discussão e conclusão

A campilobacteriose humana está frequentemente associada à infeção por espécies de *Campylobacter* termotolerantes, como *C. jejuni* e *C. coli*, e entre estas duas espécies, *C. jejuni* é a mais frequente, o que corrobora os resultados do presente estudo. A maior frequência de *C. jejuni* tem sido atribuída à idade dos doentes infetados por esta espécie, que em média é inferior à idade dos doentes infetados por *C. coli* (5). No caso do presente estudo, o facto de a maioria dos doentes infetados serem crianças pode explicar a predominância de *C. jejuni*, uma vez que os dois casos de *C. coli* foram isolados em adultos.

Vários estudos referem as crianças até aos 4 anos de idade como o grupo etário de maior risco para a aquisição de infeção sintomática a *C. jejuni* (4,6). No presente estudo, a frequência de infeção por *C. jejuni* foi ligeiramente superior nas crianças entre os 5-18 anos (14,4%) em relação às crianças do grupo etário 0-4 anos (11,4%) (Tabela 2). Apesar de esta diferença não se ter revelado estatisticamente significativa ($p=0,477$), pode sugerir-se um maior contributo das fontes de contaminação de origem alimentar (carne de aves ou contaminação cruzada de alimentos crus) no grupo etário 5-18 anos, do que as fontes ambientais, que têm maior relevo para a aquisição da infeção nas crianças mais pequenas (7).

Também tem sido descrito que o género masculino é mais frequentemente infetado por *C. jejuni* do que o género feminino (4,6), facto que não foi observado no presente estudo.

Quanto à apresentação clínica, é de sublinhar a presença de diarreia com sangue como fortemente associada à infeção por *C. jejuni*, quer considerando toda a população em estudo, quer somente o grupo etário ≤ 18 anos, o que contrasta com dados da literatura que referem que cerca de metade dos casos estão associados a diarreia aquosa, não sanguinolenta (4,8).

Em conclusão, e apesar das limitações do estudo, relativas à dimensão da população alvo e/ou período de tempo em que o mesmo decorreu, pode-se sugerir que existe uma associação entre a infeção por *C. jejuni* e a presença de sintomas de diarreia aguda sanguinolenta, em particular na população pediátrica. Para além da necessidade de uma análise estatística mais profunda para controlar o efeito de outras variáveis, os resultados deste estudo evidenciam a importância de se desenvolver um estudo mais alargado que comprove as hipóteses aqui apresentadas. Para isso, e tendo em conta que a campilobacteriose humana é, atualmente, uma Doença de Declaração Obrigatória, o INSA irá assumir as suas responsabilidades, em parceria com a Direção-Geral da Saúde, na monitorização e vigilância laboratorial desta e de outras patologias a nível nacional.

_Agradecimentos

Às unidades de saúde que participaram neste estudo nomeadamente, o Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho, a CUF Porto, o Centro Hospitalar Póvoa Varzim/Vila Conde, o Hospital de Braga, o Centro Hospitalar do Alto Ave, o Hospital de Santa Luzia, o Centro Hospitalar Cova da Beira, o Centro Hospitalar de Coimbra, o Centro Hospitalar Tondela/Viseu, o Centro Hospitalar Baixo Vouga, o Centro Hospitalar do Médio Tejo, o Hospital Distrital de Santarém, o Laboratório de Análises Clínicas Labeto, o Centro Hospitalar de Lisboa Central, o Hospital Cascais Dr. José de Almeida, o Hospital Fernando Fonseca, o Hospital Beatriz Ângelo, a Unidade Local de Saúde do Baixo Alentejo e o Centro Hospitalar do Algarve pela preparação do material biológico. Ao Dr. Alfredo Rodrigues da Isoder/RBiopharm pelo transporte para o INSA de todo o material biológico. À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Moore JE, Corcoran D, Dooley JS, et al. *Campylobacter*. *Vet Res*. 2005; 36(3):351-82. [LINK](#)
- (2) Wassenaar TM, Blaser MJ. Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. *Microbes Infect*. 1999; 1(12):1023-33.
- (3) Silva J, Leite D, Fernandes M, et al. *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Front Microbiol*. 2011;2:200. [LINK](#)
- (4) European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2013: reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC, 2013. [LINK](#)
- (5) Bessède E, Lehours P, Labadi L, et al. Comparison of characteristics of patients infected by *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter fetus*. *J Clin Microbiol*. 2014;52(1):328-30.
- (6) Lehours P, Aladjidi N, Sarlangue J, et al. [*Campylobacter* infections in children]. *Arch Pediatr*. 2012;19(6):629-34.
- (7) French NP, Midwinter A, Holland B, et al. Molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolates from wild-bird fecal material in children's playgrounds. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(3):779-83. [LINK](#)
- (8) European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal*. 2013; 11(4):3129 [250 pp]. [LINK](#)

Infeções gastrointestinais parasitárias em doentes sintomáticos: estudo observacional, setembro-novembro 2012

Cláudia Júlio, Mónica Oleastro

claudia.julio@insa.min-saude.pt

Laboratório Nacional de Referência de Infeções Gastrointestinais. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

Introdução

Giardia duodenalis é considerado o flagelado parasita mais comum do trato gastrointestinal dos vertebrados, possuindo um ciclo de vida monoxênico, em que a forma quística infeta o hospedeiro por via alimentar (1). O espectro clínico varia desde um quadro assintomático até ao aparecimento de episódios diarreicos, muitas vezes associados à perda de peso por má absorção intestinal (2). A giardiose é atualmente considerada uma parasitose re-emergente, apresenta uma distribuição à escala mundial e ocorre frequentemente sob a forma de surto (3).

Cryptosporidium spp. é um protozoário ubíquo, intracelular obrigatório, causador de infeção entérica em humanos e animais, designada por criptosporidiose (4). Foram já identificadas 26 espécies, das quais, seis são agentes etiológicos responsáveis pela infeção em humanos, sendo as mais comuns *C. hominis*, *C. parvum* e *C. meleagridis*, muito embora e ocasionalmente possam ocorrer infeções por *C. cuniculus*, *C. felis* e *C. canis* (5). A doença caracteriza-se por diarreia aguda e autolimitada na população saudável, sendo profusa e crónica no doente imunocomprometido e nas crianças durante o primeiro ano de vida. Apesar dos sintomas mais frequentes estarem associados à infeção do intestino delgado, o parasita também pode afetar outros órgãos do aparelho digestivo e também do aparelho respiratório, em particular os pulmões (6).

Entamoeba histolytica é o protozoário responsável pela disenteria amibiana bem como pelo aparecimento do abscesso hepático amibiano (7). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), ocorrem anualmente 50 milhões de novos casos sintomáticos e 100.000 mortes em todo o mundo (8). Cerca de 90% das infeções são provocadas por *E. dispar* e 10% por *E. histolytica* (9). Este pa-

rasita tem a capacidade de destruir todos os tecidos e órgãos do corpo humano. Após a colonização intestinal os trofozoítos (forma trófica) disseminam para o fígado e daí para os restantes órgãos, sendo os mais afetados o cérebro, os pulmões e os olhos (10).

Segundo o relatório de 2013 do *European Centre for Diseases Prevention and Control* (ECDC), a incidência de giardiose foi de 5,49 casos por 100.000 habitantes nos países da União Europeia, tendo o maior número de casos ocorrido em crianças do género masculino com idade inferior a 5 anos (11). Segundo o mesmo relatório, a incidência de criptosporidiose (2 casos por 100.000 habitantes) tem-se mantido constante ao longo dos últimos cinco anos nos países da União Europeia. As crianças com idade inferior a 5 anos são consideradas um grupo de risco, apresentando uma taxa de incidência de 13,8/100.000 e 10,5/100.000, para o género masculino e feminino respetivamente (11). Em Portugal, os dados sobre a incidência destas infeções parasitárias são escassos, particularmente para a infeção por *E. histolytica*.

Objetivo

Com este estudo pretendeu-se conhecer a frequência de infeções por *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* sp. e *E. histolytica* em doentes com sintomas de infeção gastrointestinal, que recorreram às urgências ou consultas hospitalares entre setembro e novembro de 2012.

Material e métodos

Foi utilizado um modelo de estudo observacional, transversal.

Participaram no estudo, os Laboratórios de Microbiologia dos Serviços de Patologia Clínica de 22 hospitais, distribuídos de norte a sul de Portugal Continental. Durante o período de estudo, todos os laboratórios hospitalares recolheram e prepararam uma amostra de fezes por doente com quadro clínico compatível com infeção gastrointestinal. As amostras biológicas foram posteriormente enviadas ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), acompanhadas de um questionário, desenhado para o efeito, com dados demográficos e clínicos sobre os doentes elegíveis para o estudo.

O diagnóstico laboratorial de *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* sp., *E. histolytica/dispar* foi efetuado pelo método ELISA (Ridascreen®

artigos breves_ n. 10

Giardia, Ridascreen® *Cryptosporidium* e Ridascreen® *Entamoeba*, R-biopharm AG, Alemanha). Nas amostras com resultado de ELISA positivo para *E. histolytica/dispar*, a diferenciação entre a espécie patogénica *E. histolytica* e a não patogénica, *E. dispar*, foi efetuada por PCR em tempo real utilizando sondas FRET, após a extração automática de DNA (EasyMag, bioMerieux, França).

Para a análise descritiva recorreu-se ao cálculo de frequências absolutas e relativas. A análise univariada dos dados foi efetuada recorrendo ao software IBM SPSS (versão 22). A intensidade de associação entre variáveis foi estudada aplicando o teste do χ^2 ou o teste exato de Fisher, nos casos em que as frequências esperadas foram inferiores ou iguais a 5. Para todos os testes estatísticos utilizados foi considerado um nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

No total foram analisadas 812 amostras de fezes de doentes com um quadro clínico de infeção gastrointestinal, sendo que 91,9% (747/812) dos doentes apresentavam amostras com uma consistência diarreica e 8,0% (65/812) tinham uma consistência pastosa. A idade média dos doentes foi de 34,3 anos (idade mínima=2 semanas; idade máxima=99 anos); 424 (52,2%) doentes pertenciam ao género masculino e 397 (48,9%) eram crianças com idade ≤ 18 anos.

O diagnóstico laboratorial mostrou que 8,7% (71/812) das amostras foram positivas, pelo menos, para um dos parasitas analisados. Verificou-se que nos 71 indivíduos infetados, 63 (88,7%) apresentavam infeção por um único parasita, dos quais 20,6% (13/63) foram infeções por *G. duodenalis*, 27,0% (17/63) por *Cryptosporidium* sp., 23,8% (15/63) por *E. histolytica* e 28,6% (18/63) por *E. dispar* (Tabela 1). Estes resultados contrariam os obtidos em trabalhos realizados noutros países, em que a prevalência de infeções por *G. duodenalis* é mais elevada do que a prevalência por *Cryptosporidium* sp e *E. histolytica* (12, 13). Igualmente noutros países, a razão das infeções por *E. dispar*/infeções por *E. histolytica* é de 3:1, sendo a espécie não patogénica *E. dispar* responsável pela maioria das colonizações (14). No presente estudo observou-se uma razão de 1:1. Nos oito (11,3%) doentes, em que foram detetados dois parasitas em simultâneo, um doente apresentou uma infeção por *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* sp., um outro doente estava infetado com *Cryptosporidium* sp. e *E. dispar*, um outro com *G. duodenalis* e *E. dispar* e nos restantes cinco doentes a infeção simultânea foi por *G. duodenalis* e *E. histolytica*. A coinfeção parasitária tem sido descrita por vários autores (9, 10, 14), devendo-se fundamentalmente à grande disseminação das formas de resistência e à facilidade com que estas são transmitidas e veiculadas pela mesma fonte como a água e os alimentos contaminados.

Tabela 1: Distribuição percentual das infeções parasitárias por agente etiológico, idade, género e sintomatologia, após exclusão dos casos de coinfeção.

Idade	Resultados positivos			
	<i>G. duodenalis</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>E. histolytica</i>	<i>E. dispar</i>
Crianças (≤ 18 anos)	15,9% (10/63)	22,2% (14/63)	12,7% (8/63)	12,7% (8/63)
Adultos (>18 anos)	4,8% (3/63)	4,8% (3/63)	11,1% (7/63)	15,8% (10/63)
Género				
Feminino	7,9% (5/63)	11,1% (7/63)	9,5% (6/63)	15,9% (10/63)
Masculino	12,7% (8/63)	15,9% (10/63)	14,3% (9/63)	12,7% (8/63)
Sintomatologia*				
Diarreia	10,7% (6/56)	10,7% (6/56)	21,4% (12/56)	8,9% (5/56)
Diarreia aquosa ou com sangue e outros sintomas**	7,1% (4/56)	16,1% (9/56)	3,6% (2/56)	12,5% (7/56)
Sem Diarreia e outros sintomas**	3,6% (2/56)	1,8% (1/56)	0,0%	3,6% (2/56)

* 7 doentes sem informação clínica e com resultado positivo para qualquer um dos agentes etiológicos.

** Outros sintomas incluem dor abdominal, desidratação, febre e vômitos.

artigos breves_ n. 10

A distribuição das infeções parasitárias ao longo do tempo mostrou que todas foram mais frequentes no mês de setembro, sendo a infeção por *E. histolytica/dispar* a que apresentou maior número de casos (34,9%, 22/63). Em relação à distribuição por regiões de saúde (zona norte, centro, Lisboa e vale do Tejo e sul) observou-se maior frequência para a infeção por *E. histolytica/dispar* na região norte (28,6%, 18/63) e para as infeções por *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* sp. na região da grande Lisboa (11,1%, 7/63 e 20,6%, 13/63; respetivamente) quando comparado com as restantes regiões.

A frequência de *Cryptosporidium* sp. foi significativamente mais elevada nas crianças do que nos adultos (22,2% versus 4,8%, $p=0,013$), particularmente para o grupo etário dos 0-4 anos. Em relação ao género, as frequências de infeção por *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* sp. e *E. histolytica* foram superiores nos homens, em oposição à infeção por *E. dispar* que foi mais frequente no género feminino (Gráfico 1). Os dados anuais do ECDC suportam os obtidos neste estudo para as infeções por *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* sp. (11).

Dos 56 casos positivos para *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* sp, 23 (41,1%) doentes apresentaram diarreia com ou sem outros sintomas. Em relação à infeção por *E. histolytica* todos os doentes apre-

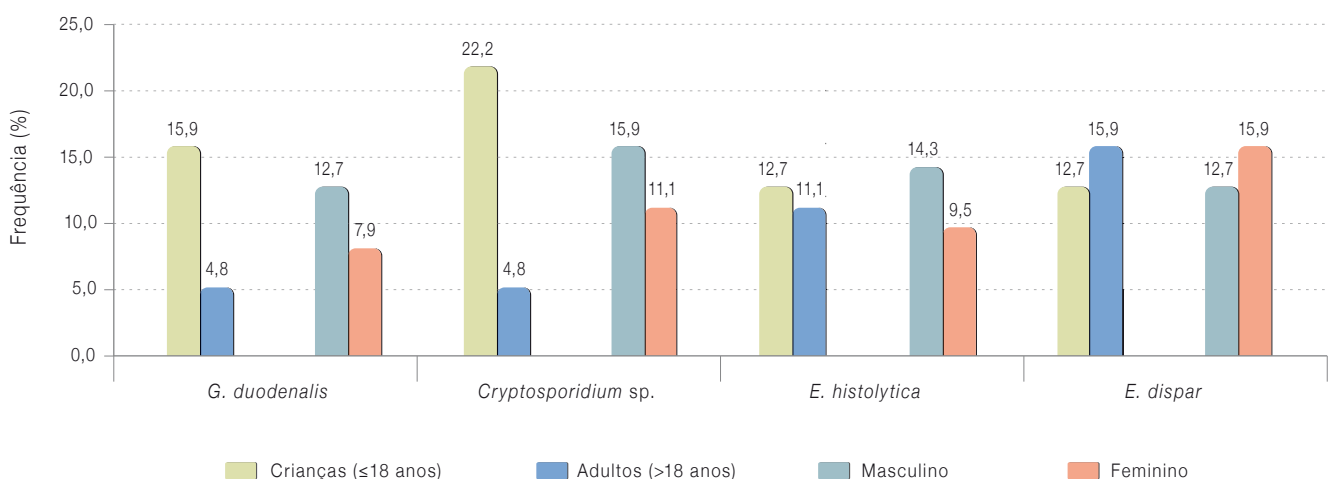
sentaram um quadro diarreico. Não podendo excluir a infeção por outros agentes etiológicos, observou-se que todos os doentes com infeção por *E. dispar*, espécie não patogénica, apresentaram sintomatologia (25%; 14/56) (Tabela 1).

_Conclusão

Em conclusão, os resultados obtidos foram semelhantes aos descritos noutros países europeus (13, 14, 15), no entanto salienta-se que o número de casos de infeção por *E. histolytica* foi comparável ao número de casos das restantes infeções parasitárias. Este facto, contradiz os resultados de outros estudos, em que a infeção por *E. histolytica* é esporádica e três vezes menos frequente do que a infeção por *E. dispar*.

Apesar das limitações do estudo, nomeadamente no que respeita à dimensão da população alvo e/ou duração do estudo, os resultados obtidos indiciam que estas infeções parasitárias são uma realidade em Portugal e que, por isso, requerem uma abordagem nacional para a sua prevenção e controle. Neste sentido, a recente inclusão da giardiose e da criptosporidiose na lista de Doenças de Declaração Obrigatória, por decisão do Ministério da Saúde e da Direção-Geral da Saúde, irá ser mais um passo crucial para a vigilância epidemiológica destas infeções.

Gráfico 1: Distribuição das infeções parasitárias por agente etiológico, idade e género, após exclusão dos casos de coinfeção (n=63).



_Agradecimentos

Às unidades de saúde que participaram neste estudo nomeadamente, o Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho, a CUF Porto, o Centro Hospitalar Póvoa Varzim/Vila Conde, o Hospital de Braga, o Centro Hospitalar do Alto Ave, o Hospital de Santa Luzia, o Centro Hospitalar Cova da Beira, o Centro Hospitalar de Coimbra, o Centro Hospitalar Tondela/Viseu, o Centro Hospitalar Baixo Vouga, o Centro Hospitalar do Médio Tejo, o Hospital Distrital de Santarém, o Laboratório de Análises Clínicas Labeto, o Centro Hospitalar de Lisboa Central, o Hospital Cascais Dr. José de Almeida, o Hospital Fernando Fonseca, o Hospital Beatriz Ângelo, a Unidade Local de Saúde do Baixo Alentejo e o Centro Hospitalar do Algarve pela preparação do material biológico. Ao Dr. Alfredo Rodrigues da Isoder/RBiopharm pelo transporte para o INSA de todo o material biológico. À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Cacciò SM, Sprong H. Epidemiology of Giardiasis in Humans. In: *Giardia: a model organism* (eds HD Luján, S Svård). New York: Springer Wien, 2011, p. 17-28.
- (2) Robertson LJ, Hanevik K, Escobedo AA, et al. Giardiasis – why do the symptoms sometimes never stop? *Trends Parasitol.* 2010;26(2):75-82.
- (3) Thompson RCA, Monis PT. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Adv. Parasitol.* 2004; 58, 69-137.
- (4) Chalmers RM, Katzer F. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Cell Press.* 2013; 29(5):237-251.
- (5) Ryan UM, Xiao L. Molecular epidemiology and typing of non-human isolates of *Cryptosporidium*. In: *Giardia and Cryptosporidium: from molecules to disease.* (eds Ortega-Pierres G, Cacciò S, Fayer R, et al). Wallingford, UK ; Cambridge, MA : CABI, 2009, p. 65-80.
- (6) Xiao L, Fayer R, Ryan U, et al. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17(1):72-97. [LINK](#)
- (7) Marn H, Ignatius R, Tannich E, et al. Amoebic liver abscess with negative serologic markers for *Entamoeba histolytica*: mind the gap! *Infection* 2012; 40(1):87-91.
- (8) World Health Organization. *Weekly Epidemiological Record.* 1997 4 apr; 72(14): 97-100. [LINK](#)
- (9) Jackson TF. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are distinct species; clinical, epidemiological and serological evidence. *Int. J. Parasitol.* 1998; 28(1):181-6.
- (10) Fletcher SM, Stark D, Harkness J, et al. Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective. *Clin. Microbiol. Rev.* 2012;25(3): 420-49. [LINK](#)
- (11) European Centre for Disease Prevention and Control. *Annual epidemiological report 2013: reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data.* Stockholm: ECDC, 2013. [LINK](#)
- (12) Amin OM. Seasonal prevalence of intestinal parasites in the United States during 2000. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Jun;66(6):799-803. [LINK](#)
- (13) Celiksöz A, Güler N, Oztop AY, et al. Prevalence of intestinal parasites in three socioeconomically-diferent regions of Sivas, Turkey. *J. Health Popul. Nutr.* 2005;23(2):184-91.
- (14) Herbinger KH, Fleischmann E, Weber C, et al. Epidemiological, clinical, and diagnostic data on intestinal infections with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* among returning travelers. *Infection.* 2011; 39(6):527-35.
- (15) González-Moreno O, Domingo L, Teixidor J, et al. Prevalence and associated factors of intestinal parasitisation: a cross-sectional study among outpatients with gastrointestinal symptoms in Catalonia, Spain. *Parasitol. Res.* 2011; 108(1): 87-93.



Novo genótipo de norovírus em doentes com gastroenterite aguda, 2011-2013

Inês Costa¹, João Mesquita², Elisabete Veiga¹,
Mónica Oleastro^{1,3}, Maria São José Nascimento⁴

monica.oleastro@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório Biologia Molecular. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(2) Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Viseu.

(3) Laboratório Nacional de Referência das Infeções Gastrointestinais. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(4) Laboratório de Microbiologia. Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Introdução

Norovírus (NoV) são um vasto grupo de vírus geneticamente relacionados que pertencem ao género *Norovirus* e à família *Caliciviridae*. Têm um genoma constituído por RNA de cadeia simples, de polaridade positiva, organizado em três sequências de leitura abertas (ORF - Open read frame), ORF1, ORF2 e ORF3 (Figura 1). A sequência ORF1 codifica seis proteínas não estruturais, entre elas a RNA polimerase. As duas proteínas que constituem a cápside, a proteína *major* VP1 e a proteína *minor* VP2, são codificadas pela ORF2 e ORF3 respetivamente. NoV apresentam uma elevada diversidade genética, sendo classificados em cinco genogrupos (GI-GV), os quais são subdivididos em genótipos. Apenas NoV dos genogrupos GI (8 genótipos), GII (19 genótipos) e GIV têm sido associados a infeções humanas. Os restantes genogrupos têm sido encontrados apenas em animais (1).

A transmissão deste vírus entérico é fecal-oral, quer através da ingestão de água e alimentos contaminados, quer por contacto direto pessoa-a-pessoa. Constituem também importantes fontes de contaminação, o contacto da mucosa oral com os aerossóis formados durante o vómito e o contacto com superfícies contaminadas com material fecal ou vómito. NoV é um dos agentes mais frequente da infeção gastrointestinal aguda, afetando todos os grupos etários, e está também na origem da maioria dos surtos de origem alimentar (2).

Reconstruindo a história evolutiva do genogrupo GII.4, o mais frequentemente associado à infeção no homem, tem-se observado

um grande impacto na saúde humana, causado pelo aparecimento de novas variantes, que resultam de recombinação inter e intragenótipos (1, 2). A variabilidade antigénica, em resposta à imunidade adquirida, favorece o aparecimento de novas variantes de GII.4 (1), que ocorre com uma regularidade de dois a três anos (4). Diversos estudos mostram uma correlação entre o aparecimento de uma nova variante de GII.4 e o aumento, quer do número de surtos, quer da taxa de ataque por surto (2, 3, 5).

Desde meados da década de 90, as novas variantes de GII.4 foram responsáveis por 62% a 80% dos surtos provocados por vírus entéricos, a nível mundial (1). Em março de 2012, surgiu uma nova variante GII.4, que foi identificada pela primeira vez na Austrália, sendo designada NoVGII.4 Sidney2012 (1, 5).

Objetivos

Neste estudo pretendeu-se analisar a diversidade genética das estirpes de NoV em doentes com quadro clínico de gastroenterite aguda, que recorreram às urgências ou consultas hospitalares entre maio de 2011 e abril de 2013, e avaliar a presença da nova variante NoV GII.4 Sidney2012 em Portugal.

Material e métodos

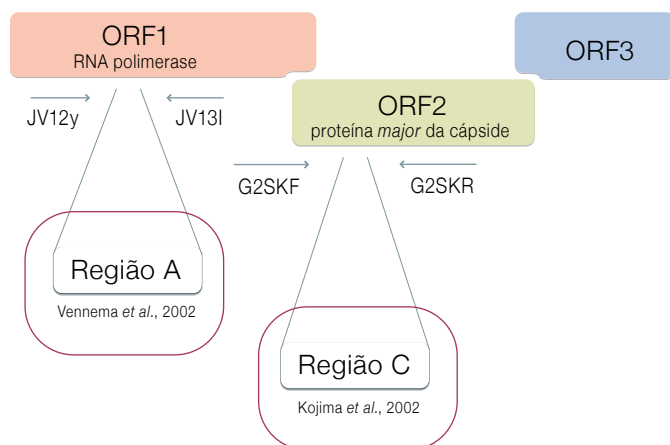
Foi utilizado um modelo de estudo observacional, transversal. Foram incluídos no estudo todos os doentes com um quadro clínico de infeção gastrointestinal com diarreia aguda, que se deslocaram a 13 Hospitais de Portugal Continental entre maio de 2011 e abril de 2013. Durante este período, todos os laboratórios hospitalares recolheram e prepararam uma amostra de fezes de cada um dos doentes elegíveis para o estudo.

O RNA viral foi extraído com um método automático NucliSens® easyMAG™ (bioMérieux). Na reação de RT-PCR foi usado o kit comercial One-Step RT-PCR (Qiagen), e utilizados dois pares de primers, um para a região da RNA polimerase viral (região A) (6) e o outro para a região da proteína major da cápside viral (região C) (7) (Figura 1). Os produtos amplificados foram purificados com ExoSap (GE Healthcare) e sequenciados, por sequenciação de Sanger com Big Dye Terminator v1.1 (Applied Biosystems), no Sequencer Analyser ABI-Prism 3130 xl (PE Applied Biosystems). As sequências

artigos breves_ n. 11

foram analisadas usando o programa de análise e genotipagem de NoV disponibilizado pelo RIVM (*National Institute for Public Health and the Environment*; www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool). Foi feita uma análise filogenética das sequências obtidas com Software MEGA 5.1 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*). Para a análise descritiva dos dados obtidos recorreu-se ao cálculo de frequências absolutas e relativas.

Figura 1: Representação esquemática do genoma de norovírus e localização das regiões - região A e região C usadas para a genotipagem das estirpes.

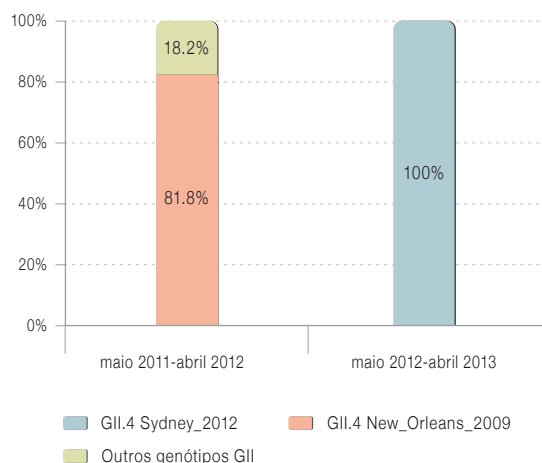


Resultados

Entre maio de 2011 e abril de 2013, foram recebidas no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) 580 amostras de fezes, isoladas de doentes com gastroenterite aguda. Foram identificadas como positivas para NoV, 67 (11,6%) amostras, das quais 41 (61,2%) foram genótipo II (GII). As 41 amostras genotipadas eram provenientes de doentes com idades compreendidas entre dois meses e 91 anos, sendo 25 (61,0%) do género masculino e 16 (39,0%) do género feminino.

As amostras obtidas entre maio 2011 e abril 2012 (n=22) mostraram uma grande diversidade de genótipos, nomeadamente GII.1 (1/22) 4,5%, GII.3 (1/22) 4,5%, GII.6 (1/22) 4,5%, GII.8 (1/22) 4,5%, e com predominio do genótipo GII.4 New Orleans 2009 (81,8%, 18/22) (Gráfico 1). A partir de maio de 2012, observou-se uma mudança do genótipo circulante. De facto, todas as amostras analisadas (n=19) foram identificadas como sendo a nova variante GII.4 Sidney_2012 (Gráfico 1).

Gráfico 1: Distribuição temporal das estirpes de norovírus, com base no resultado da análise da genotipagem da região A e C, maio 2011- abril 2013.



Discussão e conclusão

Este é um dos primeiros estudos a descrever a circulação da nova variante NoV GII.4 Sidney2012 em Portugal (8). Esta nova variante, identificada pela primeira vez na Austrália em 2012 (9), rapidamente, e devido aos fluxos migratórios, teve uma disseminação mundial, tendo sido responsável por um aumento do número de surtos de gastroenterite em todo o mundo nos últimos dois anos (1, 5). Portugal não foi exceção, e este estudo comprova a presença e o predomínio da nova variante NoV GII.4 Sidney2012 desde maio de 2012. No entanto, e por forma a relacionar-se esta estirpe emergente de NoV a surtos de gastroenterite no nosso país, será da maior importância desenvolver um sistema de vigilância de surtos de toxinfecções alimentares de âmbito nacional, à semelhança de outros países europeus.

Agradecimentos

Às unidades de saúde que participaram neste estudo nomeadamente, o Centro Hospitalar Cova da Beira, o Centro Hospitalar de Setúbal, o Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho, o Centro Hospitalar do Médio Tejo, o Centro Hospitalar Tondela/Viseu, o Hospital Cascais Dr. José de Almeida, o Hospital da Luz, o Hospital de Santo António, o Hospital Distrital de Santarém, o Hospital Dona Estefânia, o Hospital Fernando Fonseca, o Hospital Pediátrico de Coimbra, o Hospital Universitário de Coimbra pela preparação do material biológico. Ao Dr. Alfredo Rodrigues da Isoder/RBiopharm pelo transporte para o INSA de todo o material biológico. À Unidade de Tecnologia e Inovação do Departamento de Genética Humana / INSA pela realização da sequenciação capilar. À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.



artigos breves_ n. 11

Referências bibliográficas:

- (1) Eden J-S, Tanaka MM, Boni MF, et al. Recombination within the Pandemic Norovirus GII.4 Lineage. *J. Virol.* 2013;87(11): 6270-82. [LINK](#)
- (2) Debbink K, Lindesmith LC, Donaldson EF, et al. Norovirus Immunity and the Great Escape. *PLoS Pathog.* 2012; 8(10): e1002921. [LINK](#)
- (3) Marshall JA, Bruggink LD. The dynamics of norovirus outbreak epidemics: recent insights. *Int J Environ Res Public Health.* 2011;8(4):1141-9. [LINK](#)
- (4) Bennett S, MacLean A, Miller RS, et al. Increased norovirus activity in Scotland in 2012 is associated with the emergence of a new norovirus GII.4 variant. *Euro Surveill.* 2013;18(2): pii=20349. [LINK](#)
- (5) van Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, et al. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Euro Surveill.* 2013 ;18(1) : :pii=20345. [LINK](#)
- (6) Vennema H, de Bruin E, Koopmans M. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J. Clin. Virol.* 2002;25(2):233-5.
- (7) Kojima S, Kaheyama T, Fukushi S, et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Vir Methods.* 2002;100(1-2):107-14.
- (8) Mesquita JR, Costa I, Oleastro M, et al. First report of a norovirus outbreak caused by the new variant Sydney 2012 in Portugal. *J Infect Dev Ctries.* (In press).
- (9) Wong TH, Dearlove BL, Hedge J, et al. Whole genome sequencing and de novo assembly identifies Sydney-like variant Noroviruses and recombinants during the winter 2012/2013 outbreak in England. *J. Virol.* 2013;10: 335. [LINK](#)



Salmonella enterica: serotipos menos frequentes com importância em patologia humana, caracterizados no INSA entre 2002-2013

Leonor Silveira¹, Adelaide Marques¹, João Santos¹,
Cristina Furtado², Jorge Machado¹

jorge.machado@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório Nacional de Referência de Infeções Gastrointestinais. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(2) Unidade de Referência e Vigilância Epidemiológica. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

_Introdução

Durante os últimos anos, os serotipos de *Salmonella enterica* identificados com maior frequência em amostras humanas têm sido *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* 4,5:i:- (1).

Contudo, existem outros serotipos que, apesar de menos frequentes, são igualmente responsáveis por salmoneloses e, por isso, também importantes em saúde pública.

_Objetivo

Este estudo tem como objetivo descrever os serotipos de *Salmonella enterica* menos frequentes, que foram identificados no Laboratório Nacional de Referência de Infeções Gastrointestinais do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre 2002 e 2013.

_Métodos

Foi realizada uma análise retrospectiva dos serotipos menos frequentes responsáveis por casos de infeção por *Salmonella enterica* caracterizados no INSA entre 2002 e 2013. Os serotipos foram determinados de acordo com o esquema de classificação Kauffmann-White-de Minor (2).

_Resultados

No período em estudo, foram identificadas 394 estirpes pouco frequentes de *Salmonella enterica*, correspondendo a 113 serotipos diferentes associados a salmoneloses humanas.

Na Tabela 1 apresentam-se 42 serotipos, dos 113 identificados, com pelo menos três estirpes de *Salmonella enterica* isoladas. Os restan-

tes 71 serotipos foram identificados em um ou dois doentes durante o período em estudo (Tabela 2).

Os serotipos mais identificados foram S. Rissen (32), S. Derby (27), S. Newport (14), S. Brandenburg (13), S. Bredeney (13), S. Heidelberg (12), S. Infantis (12), S. Bovismorbificans (11), S. Essen (11) e S. Give (11) (Tabela 1, Gráfico 1).

_Discussão e Conclusão

Apesar dos 10 serotipos mais identificados serem considerados raros na Europa (3), a maior parte foi associado a surtos ocorridos em locais de produção suína, bovina e avícola em Portugal, com a exceção de S. Essen (4, 5, 6). Acrescente-se, que estes e outros serotipos foram igualmente identificados noutros países em surtos com origem na indústria de produção animal, em particular aviária. (8, 9, 10, 11).

Alguns dos serotipos referidos, por exemplo S. Rissen, S. Derby, S. Brandenburg, S. Bredeney, S. Heidelberg, S. Infantis, S. Bovismorbificans e S. Give, podem ser encontrados em diferentes tipos de carnes, não sendo possível associá-los a uma origem específica (6, 9).

Em répteis e outros animais de sangue frio, muito procurados atualmente como animais de estimação, existem serotipos (S. Newport, S. Infantis, S. Bovismorbificans, S. London, S. Montevideo, S. Istanbul, S. Mbandaka, S. Bareilly, S. Oslo, S. Pomona, S. San Diego, S. Poona, S. Chester, S. Kentucky, S. Muenchen, S. Panama, S. Senftenberg, S. Stanley e S. Teitelkebir) potencialmente associados a surtos de salmonelose em humanos (7, 11, 12).

A maioria dos serotipos apresentados neste estudo foi descrita pela primeira vez em Portugal e estiveram relacionados com salmoneloses humanas. Saliente-se, que no ano de 2013 foram identificados oito serotipos nunca antes detetados no INSA (S. Colorado, S. Potsdam, S. Reading, S. Djakarta, S. Stanleyville, S. Grampian, S. Oslo, S. Panama).

A baixa frequência destes serotipos na comunidade aumenta a importância dos laboratórios de referência na identificação de casos raros de doença, muitas vezes graves e até mesmo letais.

artigos breves_ n. 12

Tabela 1: Serotipos de *Salmonella enterica* identificados no LNR de *Salmonella* do INSA entre 2002 e 2013.

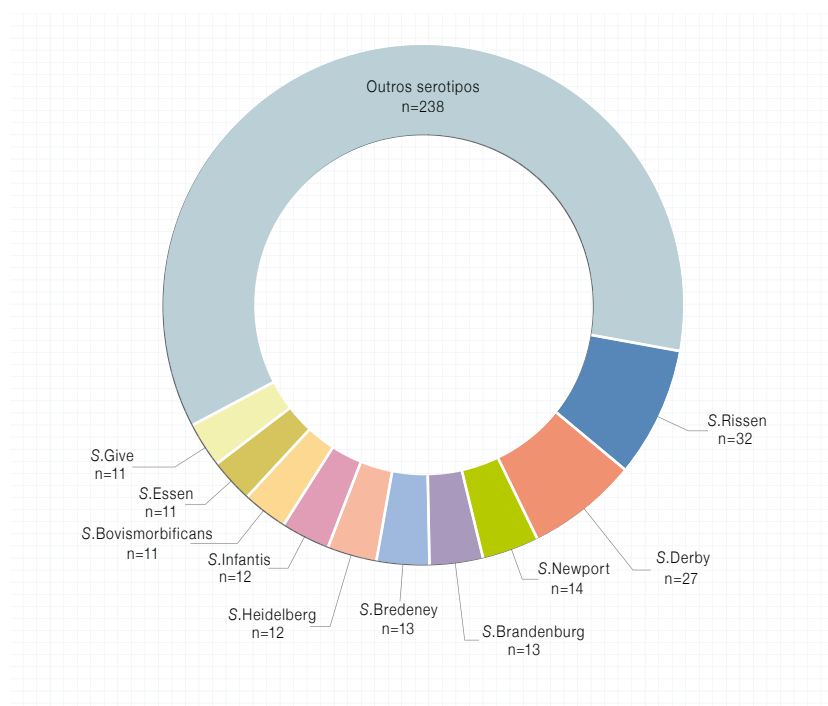
Serotipo	Ano												Total Geral
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	
S.Rissen			2	4	3		4	9	1	2	5	2	32
S.Derby	2	1	3	5		3	2	3	3	1	3	1	27
S.Newport				1		3	4	1			1	4	14
S.Brandenburg	1		1	1	2	4	4						13
S.Bredeney	1	2	1	2			1	2	1	3			13
S.Heidelberg		2		2		3	2		1		1	1	12
S.Infantis		1		1	1	3	1	1		2	2		12
S.Bovismorbificans					1	6	1	2	1				11
S.Essen	1	3		4	2						1		11
S.Give		1			3	1	2			2		2	11
S.London						2	2	1		1		3	9
S.Hadar	1	2	3	1			1				1		9
S.Goldcoast					2	3		1		1	1		8
S.Braenderup		1			3	2		1	1				8
S.Agona			1				1		2		1	2	7
S.Muenchen		3				1		1	1		1		7
S.Haifa			3		2		1						6
S.Saintpaul		2	3	1									6
S.Virchow	1	1	2	1	1								6
S.Pomona					1			2				2	5
S.Budapest		1				1				2	1		5
S.Urbana									1		2	2	5
S.Dublin					1			1		1	1	1	5
S.Paratyphi B		1						3		1			5
S.Anatum			1	2							1	1	5
S.Brikama		2	1			1				1			5
S.Mikawasima					1	2		2					5
S.Thompson							1	2	1				4
S.Stanley									1	2		1	4
S.Bardo			3			1							4
S.Ndolo								2	1			1	4
S.Senfthenberg	2											1	3
S.Elomrane					2	1							3
S.Kedougou						1		2					3
S.Tudu	1		1	1									3
S.Schwarzengrund								3					3
S.Montevideo							2			1			3
S.Istanbul	1		1	1									3
S.Paratyphi A							1				2		3
S.Mbandaka		1			1				1				3
S.Norwich		1		2									3
S.Menden		1	1		1								3

artigos breves_ n. 12

Tabela 2: ⚡ Outros serotipos de *Salmonella enterica* identificados entre 2002 e 2013 (n=71).

Serotipo					
S.Tallahassee	S.Ramsey	S.Poona	S.Kentucky	S.Djakarta	S.Tilburg
S.Ohio	S.Tanzania	S.Lindenburg	S.Gatow	S.Bouso	S.Oslo
S.Canada	S.Colorado	S.Regent	S.Havana	S.Sljeme	S.Uppsala
S.Houston	S.Crewe	S.Litchfield	S.Bochum	S.Nchanga	S.Panama
S.Friednau	S.Veneziana	S.Sanktjohann	S.Potsdam	S.Stanleyville	S.Vegesack
S.Bareilly	S.Agama	S.Cuckmere	S.Menston	S.Grampian	S.Bassa
S.Telkebir	S.Coeln	S.Duesseldorf	S.Reading	S.Suberu	S.Hato
S.Giza	S.Kunduchi	S.Colindale	S.Cyprus	S.Grupensis	S.Kingston
S.Manhattan	S.Stendal	S.Concord	S.Chester	S.Tambacounda	S.Wentworth
S.Freiburg	S.Lagos	S.Fyris	S.Minnesota	S.Ahoutoue	S.Kintambo
S.Vitkin	S.Bellevue	S.Kalina	S.Sandiego	S.Ituri	S.Kubacha
S.Manchester	S.Larochelle	S.Marshall	S.Goettingem	S.Haduna	

Gráfico 1: ⚡ Distribuição dos 113 serotipos de *Salmonella enterica* identificados entre 2002 e 2013.



artigos breves_ n. 12

Em conclusão, pode-se afirmar que a vigilância das estirpes de *Salmonella* spp. em circulação em Portugal carece de informação demográfica, clínica e epidemiológica dos doentes envolvidos, que permita, de forma atempada, detetar surtos e/ou casos esporádicos de infeção por serotipos raros ou mesmo nunca antes detetados. Acrescente-se, que a vigilância das infeções gastrointestinais em geral, e por *Salmonella* spp em particular, passa obrigatoriamente, pela articulação e colaboração permanentes das entidades responsáveis pela saúde humana, saúde veterinária e cadeia alimentar.

_Agradecimentos

Os autores agradecem à Dra. Patrícia Conde pelas serotipagens realizadas no Laboratório Nacional de Referência de Infeções Gastrointestinais do INSA.

Referências bibliográficas:

- (1) Silveira L, Marques A, Machado J. Infeções por *Salmonella enterica* no período entre 2000-2012. Boletim Epidemiológico Observações.2013;2(Supl 1):14-16. [LINK](#)
- (2) Grimont PAD, Weill F-X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9ª ed. Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 2007. [LINK](#)
- (3) European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2013: reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC, 2013. [LINK](#)
- (4) Correia-Gomes C, Economou T, Mendonça D, et al. Assessing risk profiles for *Salmonella* serotypes in breeding pig operations in Portugal using a Bayesian hierarchical model. BMC Vet Res. 2012;8:226. [LINK](#)
- (5) Antunes P, Mourão J, Pestana N, et al. Leakage of emerging clinically relevant multidrug-resistant *Salmonella* clones from pig farms. J Antimicrob Chemother. 2011;66(9):2028-32. [LINK](#)
- (6) Clemente L, Manageiro V, Ferreira E, et al. Occurrence of extended-spectrum b-lactamases among isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* from food-producing animals and food products, in Portugal. Int J Food Microbiol. 2013;167(2):221-8.
- (7) Centers for Disease Control and Prevention. Reports of selected *Salmonella* outbreak investigations. [Em linha]. [consult. 9/4/2014]. [LINK](#)
- (8) Erol I, Goncuoglu M, Ayaz N, et al. Serotype distribution of *Salmonella* isolates from turkey ground meat and meat parts. Biomed Res Int. 2013;2013:28159. [LINK](#)
- (9) Duggan S, Jordan E, Gutierrez M, et al. *Salmonella* in meats, water, fruit and vegetables as disclosed from testing undertaken by Food Business Operators in Ireland from 2005 to 2009. Ir Vet J. 2012;65(1):17. [LINK](#)
- (10) Zewdu E, Cornelius P. Antimicrobial resistance pattern of *Salmonella* serotypes isolated from food items and personnel in Addis Ababa, Ethiopia. Trop Anim Health Prod. 2009;41(2):241-9.
- (11) Aiken AM, Lane C, Adak GK. Risk of *Salmonella* infection with exposure to reptiles in England, 2004-2007. Euro Surveillance 15 (22).
- (12) Pedersen K, Lassen-Nielsen A, Nordentoft S e Hammer A. 2008. Serovars of *Salmonella* from captive reptiles. Zoonoses Public Health. 2009;56(5):238-42.

Enterotoxinas estafilocócicas em géneros alimentícios

Rosália Furtado, Anabela Coelho, Cristina Belo Correia, Margarida Saraiva, Isabel Campos Cunha, Maria Antónia Calhau

rosalia.furtado@insa.min-saude.pt

Departamento de Alimentação e Nutrição, INSA.

Introdução

O conceito “segurança alimentar”, geralmente associado à ausência de contaminantes, físicos, químicos ou biológicos em géneros alimentícios ou água, com potencial para causar efeitos nocivos à saúde, assenta numa abordagem integrada ao longo da cadeia de produção alimentar.

A garantia de segurança dos géneros alimentícios firma-se na manutenção das Boas Práticas Agrícolas, Boas Práticas de Higiene e de Fabrico e na aplicação dos princípios HACCP (Análise de Perigos e Controlo dos Pontos Críticos) de acordo com a legislação em vigor.

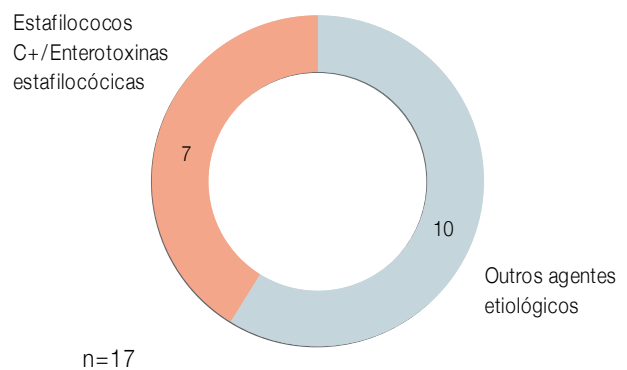
A intoxicação alimentar estafilocócica destaca-se como uma das mais comuns a nível mundial, resultando do consumo de alimentos contendo uma (ou mais) enterotoxinas preformadas por estirpes enterotoxinogénicas de estafilococos em níveis suficientes para causar doença, sendo referido em diversos estudos que a quantidade mínima necessária é de 20 ng (1).

Analisando os dados dos surtos de toxinfecções estudados pelos Laboratórios de Microbiologia do Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) em 2012 e 2013, verifica-se que o agente etiológico mais frequentemente isolado foi estafilococos coagulase positiva / enterotoxinas estafilocócicas (Gráfico 1).

Os estafilococos são bactérias ubiqüitárias podendo ser disseminados a partir de hospedeiros humanos e animais. Várias espécies produzem enterotoxinas estafilocócicas (EEs). Geralmente são estirpes coagulase-positiva, essencialmente da espécie *Staphylococcus aureus*. A principal fonte de contaminação são os manipuladores

de alimentos portadores de estirpes enterotoxinogénicas no tracto nasofaríngeo ou nas mãos. O primeiro surto descrito e investigado ocorreu nos Estados Unidos da América, no século XIX, associado à ingestão de queijo contaminado, tendo desde aí sido descritos diversos surtos relacionados com o consumo de leite / produtos lácteos consumidos crus e provenientes de animais infetados (1,2).

Gráfico 1: Surtos estudados no DAN em 2012 e 2013 com agente etiológico identificado.



Atualmente estão identificadas mais de 20 EEs das quais só algumas possuem uma atividade emética comprovada, constituindo um perigo potencial para os consumidores (2,3). São proteínas de cadeia curta, extracelulares, hidrossolúveis, estáveis e resistentes a condições ambientais adversas, em particular ao calor e às enzimas proteolíticas presentes no trato digestivo. São mais termo-resistentes em géneros alimentícios do que no laboratório em culturas, não sendo inativadas pela pasteurização e tratamentos térmicos habitualmente utilizados no processamento dos alimentos. A temperatura necessária à sua inativação depende do género alimentício onde se encontra, do pH, da toxina em causa e da sua concentração (2).

Diferentes géneros alimentícios têm sido implicados na intoxicação alimentar estafilocócica, incluindo leite, produtos de pastelaria com creme, queijos, produtos de charcutaria, saladas, refeições cozinhadas, sanduíches e molhos. Devemos ter em conta que a pasteurização destrói os estafilococos mas não tem efeito sobre as EEs. Este facto ilustra a importância da eliminação de quaisquer fontes de contaminação durante o processamento e de um sistema controlado de refrigeração de matérias-primas e de géneros alimentícios.

artigos breves_ n. 13

Os sintomas de intoxicação alimentar estafilocócica são cólicas abdominais, náuseas, vómitos, por vezes seguido de diarreia. Não são conhecidos casos em que a diarreia é a única sintomatologia. O início dos sintomas é rápido (de 30 minutos a 8 horas) e a remissão é espontânea, geralmente a partir de 24 horas. Ocasionalmente podem ocorrer manifestações severas que requeiram hospitalização e terapêutica de reidratação (4).

_Objectivo

Apresentação dos dados obtidos em programas de vigilância e de controlo de boas práticas de fabrico de indústrias de produtos lácteos, onde se realizou a pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas, em amostras colhidas durante o processo de fabrico.

_Material e métodos

Em 2012 e 2013 analisaram-se 68 amostras de produtos lácteos (5 leites e 63 queijos) no âmbito de programas de vigilância e de controlo das boas práticas de fabrico para verificar a conformidade com a regulamentação europeia relativamente à presença de enterotoxinas estafilocócicas.

O método utilizado foi o aprovado pelo Regulamento Europeu - *Detection of staphylococcal enterotoxins types SEA to SEE in all types of food matrices European screening method of the EU-RL for "coagulase positive staphylococci, including staphylococcus aureus"-Version 5, September 2010*. Este método encontra-se acreditado no Departamento de Alimentação e Nutrição do INSA pelo Instituto Português de Acreditação, segundo o referencial normativo NP EN ISO/IEC 17025:2005, sendo aplicado na deteção de enterotoxinas estafilocócicas em leites, produtos lácteos e outros géneros alimentícios. Inclui três etapas: uma extração das toxinas, seguida de uma diálise *overnight* para uma concentração até cinco vezes superior ao nível de toxina existente na amostra e por fim a deteção imunoenzimática pelo sistema automatizado VIDAS® (SET2) metodologia *Enzyme-linked fluorescent immunoassay* (ELFA), obtendo-se o resultado final em 48 horas.

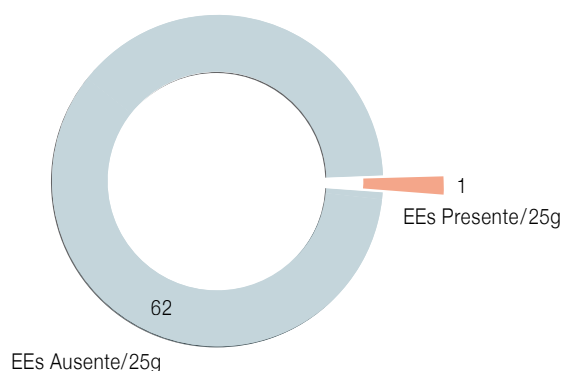
_Resultados

Detetaram-se EEs em 1 (1,5%) das amostras de queijos e nas amostras de leites analisadas não foram detetadas EEs (Tabela 1 e Gráfico 2).

Tabela 1: ↓ Deteção enterotoxinas estafilocócicas em leites e queijos.

Géneros alimentícios analisados	EEs Presente/25g	EEs Ausente/25g	Total
Queijos (frescos e de pasta mole)	1	62	63
Leites	0	5	5

Gráfico 2: ↓ Deteção de enterotoxinas estafilocócicas em queijos.



_Conclusões

O Método de Referência Europeu é o ensaio de primeira linha utilizado para a deteção de enterotoxinas estafilocócicas em géneros alimentícios colhidos no âmbito do esclarecimento de surtos de toxinfecção alimentar, e na verificação da conformidade com a regulamentação, sendo aquele que apresenta uma melhor sensibilidade, mas mesmo assim tendo como limitação o facto de os kits preconizados não detetarem todas as EEs possíveis de serem causa de intoxicação.

No Departamento, o ensaio sem concentração por diálise também se encontra acreditado pelo mesmo referencial normativo, no entanto devido à baixa quantidade de EEs presente nos géneros alimentícios, que pode originar uma toxinfecção, é aconselhável utilizar o método com concentração antes de concluir que o resultado é negativo para a pesquisa de EEs.

artigos breves_ n. 13

Os operadores alimentares e as autoridades competentes devem sempre que necessário utilizar ensaios laboratoriais baseados em metodologias sensíveis e apropriadas para a vigilância e controlo dos produtos em causa.

A implementação de sistemas de segurança alimentar permite impedir ou reduzir a produção de enterotoxinas nos géneros alimentícios por estirpes de estafilococos, assentando a prevenção da intoxicação alimentar estafilocócica no cumprimento das Boas Práticas de Higiene e no controlo dos pontos críticos.

Referências bibliográficas:

- (1) Centers for Disease Control and Prevention. Trends in the prevalence of excess dietary sodium intake - United States, 2003-2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2013 dec 20;62(50):1021-5. [LINK](#)
- (2) Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36(4):815-36.
- (3) Hennekinne JA, Ostyn A, Guillier F. How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized?. *Toxins (Basel).* 2010;2(8):2106-16. [LINK](#)
- (4) Dromigny E. Les critères microbiologiques des denrées alimentaires: réglementation, agents microbiens, autocontrolo. Paris: Éd. Tec & doc, impr. 2011, p. 117-130.



Bacillus cereus em fórmulas desidratadas para lactentes: uma preocupação?

Ricardo Assunção^{1,2}, Rosália Furtado¹, Cristina Belo Correia¹, Paula Alvito^{1,2}

ricardo.assuncao@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Alimentação e Nutrição, INSA.

(2) CESAM, Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa

Introdução

As crianças e em particular os lactentes, pela sua vulnerabilidade, apresentam um risco de infeção mais elevado quando avaliados os agentes patogénicos que podem ser transmitidos pelos alimentos que consomem. As fórmulas desidratadas para lactentes apesar de apresentarem estabilidade microbiológica não são produtos estéreis. A flora característica deste tipo de produtos inclui bactérias como micrococcos, estreptococcos e microrganismos aeróbios formadores de esporos, como é o caso dos pertencentes ao género *Bacillus* (1). Os membros deste género, devido à sua capacidade de esporulação, são mais resistentes a condições ambientais adversas que a maioria dos agentes bacterianos enteropatogénicos (2). *Bacillus cereus* é um bacilo Gram positivo que tem como reservatório natural o solo. Este microrganismo apresenta uma distribuição ubiqüitária, e tem revelado um aumento de importância enquanto agente oportunista, nomeadamente em doentes com o sistema imunitário debilitado (3,4). Encontra-se habitualmente associado a duas formas diferentes de doença de origem alimentar, nomeadamente a síndrome emética, causada pela ingestão de toxina previamente formada no alimento e a síndrome diarreica, causada pela ingestão de uma toxina diferente da primeira e que pode ser produzida quer no alimento quer no intestino delgado após o consumo do alimento (2). Embora o número de casos documentados de doença em crianças, incluindo recém-nascidos, cuja causa tenha sido identificada como *B. cereus* seja escasso muitos foram fatais, propondo alguns autores que a ocorrência deste microrganismo e de outros do género *Bacillus* poderá ser mais comum do que o que se possa considerar, devendo ser estabelecido um controlo eficaz por forma a reduzir as potenciais fontes de contaminação (4,5,6,7). Considerando a possi-

bilidade de ocorrência de *B. cereus* em fórmulas desidratadas para lactentes e o potencial toxigenico associado à capacidade de esporulação desta bactéria, afigura-se de extrema importância, avaliar a sua presença neste tipo de produtos designadamente nos comercializados a nível nacional.

Objetivos

Avaliar a ocorrência de *B. cereus* em amostras de fórmulas desidratadas para lactentes comercializadas no distrito de Lisboa.

Material e métodos

Analisaram-se 62 amostras de fórmulas desidratadas para lactentes adquiridas em superfícies comerciais do distrito de Lisboa, entre os anos 2007 e 2010.

Efetuaram-se ensaios de quantificação (método ISO 7932: 2004 (8)) e de deteção de *B. cereus* (método interno). Para a deteção de *B. cereus* realizou-se uma etapa de enriquecimento em Água Peptonada Tamponada (bioMérieux™), incubação a 37 °C durante 18 horas, seguida de isolamento em meio Columbia Agar + 5% Sheep Blood (bioMérieux™) (37 °C durante 24 horas). No final do período de incubação selecionaram-se as colónias características de *B. cereus* e efetuaram-se as provas de confirmação: coloração de Gram, prova da lecitinase em *Bacillus cereus* Agar (Laboratoires AES™), provas da pesquisa da catalase e da oxidase. Para a pesquisa da toxina diarreica de *Bacillus cereus* utilizou-se um ensaio comercial em formato de kit, BCET-RPLA Toxin Detection Kit (Reversed Passive Latex Agglutination), Oxoid™.

Resultados e discussão

Os resultados obtidos nos ensaios de quantificação e de deteção de *B. cereus* nas 62 amostras de fórmulas desidratadas para lactentes analisadas encontram-se resumidos na **Tabela 1**.

B. cereus foi detetado em 17 (27%) das fórmulas analisadas. Nenhuma destas amostras apresentou níveis de *B. cereus* superior ao limite de deteção do método, ou seja 1.0×10^2 ufc/g (unidades formadoras de colónias por grama). Nos isolados de *B. cereus* foi avaliado o potencial para a produção da toxina, responsável pela síndrome diarreica e verificou-se que apenas 1 (6%) isolado de *B. cereus* revelou poder toxigenico (**Gráfico 1**).

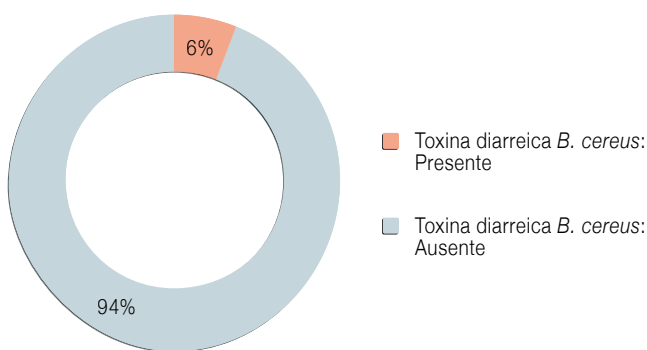
artigos breves_ n. 14

Tabela 1: Avaliação microbiológica de fórmulas desidratadas para lactentes: quantificação e deteção de *Bacillus cereus*.

Natureza da Amostra	Amostras (n° / %)	<i>Bacillus cereus</i> Deteção em 10g
Fórmulas desidratadas para lactentes	62 (100%)	
	17 (27%) ^a	Presente
	45 (73%)	Ausente

^a As estirpes de *B. cereus* detetadas foram avaliadas quanto ao seu potencial para produção de toxina diarreica.

Gráfico 1: Poder toxigenético dos isolados de *B. cereus* (método BCET-RPLA, Oxoid™).



No presente estudo foi detetada a presença de *B. cereus* em 27% das amostras analisadas. Estes resultados evidenciam um nível de contaminação baixo e inferior a 1.0×10^2 ufc/g (limite de deteção do método). A nível laboratorial, estes resultados reforçam a importância da utilização de metodologias que permitam detetar baixos níveis de contaminação em matrizes deste tipo.

O controlo de *B. cereus* na produção primária e em particular nas indústrias de fabrico de fórmulas desidratadas destinadas a lactentes pode apresentar algumas dificuldades. Os processos térmicos de eliminação de microrganismos, designadamente a pasteurização, poderão não ser eficientes na destruição deste agente patogénico, atendendo à produção de esporos termorresistentes. A presença potencial de esporos de *B. cereus* no ambiente de uma sala de preparação de fórmulas infantis é crítica, uma vez que aquando da reconstituição estes podem ser ativados com o aquecimento e as células vegetativas podem atingir teores elevados caso o alimento não seja consumido de imediato (2).

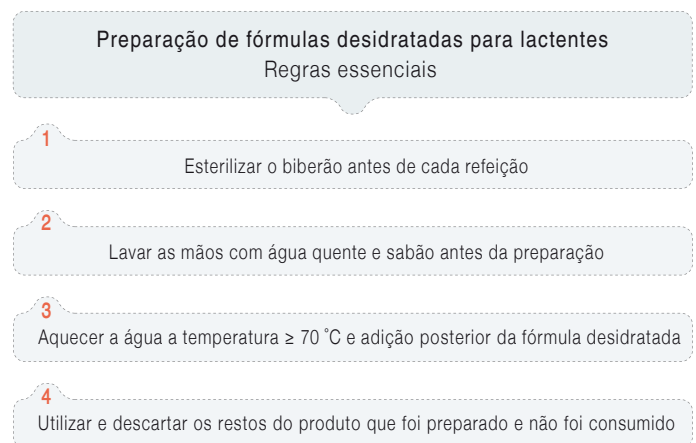
Em conformidade com o parecer sobre *Bacillus cereus* e outros *Bacillus* spp. em géneros alimentícios emitido pelo painel Biohaz da EFSA (European Food Safety Authority) relativamente a alguns alimentos desidratados, nos quais se incluem as fórmulas desidratadas destinadas a lactentes, o número de esporos de *Bacillus cereus* presentes em fórmulas para lactentes desidratadas e alimentos dietéticos desidratados deve ser o mais baixo possível durante a transformação, devendo ser estabelecidas medidas de controlo específicas incluindo o controlo da temperatura e a implementação de sistemas de segurança alimentar baseados nos princípios de análise dos perigos e de pontos de controlo críticos (10, 11).

Conclusões

Considerando que os lactentes têm um risco mais elevado de infeções, é imperativo que as fórmulas desidratadas apresentem um elevado nível de qualidade microbiológica durante a produção, distribuição e utilização. A este respeito, a Organização Mundial da Saúde publicou um conjunto de orientações a ter em conta aquando da preparação deste tipo de alimentos das quais se destacam algumas regras essenciais (Figura 2).

Este estudo reforça a importância da implementação de Boas Práticas na preparação, manipulação e conservação de fórmulas desidratadas destinadas a lactentes, de modo a garantir a obtenção de um alimento, nutricionalmente e microbiologicamente seguro.

Figura 2: Regras essenciais na reconstituição de fórmulas desidratadas para lactentes.



Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2007 (9).

Referências bibliográficas:

- (1) International Commission on Microbiological Specification for Foods. Microorganisms in foods 7: microbiological testing in food safety management. New York: Springer Science/ Business Media LLC, 2002.
- (2) Pinto AD, Bonerba E, Bozzo G, et al. Occurrence of potentially enterotoxigenic *Bacillus cereus* in infant milk powder. *Eur Food Res Technol.* 2013; 237(2):275-9.
- (3) Rajkowski KT, Bennett RW. *Bacillus cereus*. In Miliotis MD, Bier JW (eds.). *International Handbook of Foodborne Pathogens*. New York: Marcel Dekker Inc, 2003, pp. 27-40.
- (4) Hilliard NJ, Schelonka RL, Waites KB. *Bacillus cereus* bacteremia in a preterm neonate. *J Clin Microbiol.* 2003;41(7):3441-4. [LINK](#)
- (5) Decousser J, Ramarao N, Duport C, et al. *Bacillus cereus* and severe intestinal infections in preterm neonates: putative role of pooled breast milk. *Am J Infect Control.* 2013;41(10):918-21.
- (6) Rahimi E, Abdos F, Momtaz H, et al. *Bacillus cereus* in infant foods: prevalence study and distribution of enterotoxigenic virulence factors in Isfahan Province, Iran. *ScientificWorldJournal.* 2013;2013:292571. doi: 10.1155/2013/292571 [LINK](#)
- (7) Campbell JR, Hulten K, Baker CJ. Cluster of *Bacillus* species bacteremia cases in neonates during a hospital construction project. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2011;32(10):1035-8. [LINK](#)
- (8) ISO 7932:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* – Colony-count technique at 30°C. Geneva: International Organization for Standardization, 2004.
- (9) World Health Organization; Food and Agriculture Organization of the United Nations (colab.). Safe preparation, storage and handling of powdered infant formula: guidelines. Geneva: WHO, 2007. [LINK](#)
- (10) European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp in foodstuffs. *EFSA Journal.* 2005;175:1-18. [LINK](#)
- (11) Comissão Europeia. Regulamento N° 1441/2007 de 5 de dezembro, que altera o Regulamento (CE) N° 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *JO L 322/12; 7.12.2007.* [LINK](#)



ficha técnica

_ Título: Boletim Epidemiológico Observações

_ Periodicidade: Trimestral

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

_ Numeração: 2ª série
Volume 3, número especial 3
Junho 2014

_ Diretor
José Pereira Miguel, Presidente do INSA

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

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

_ Revisão Científica
Cristina Furtado, Departamento de Doenças Infecciosas
Maria Antónia Calhau, Departamento de Alimentação e Nutrição

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

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

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

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

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

www.insa.pt