

2015
número

11

2ª série

Lisboa_INSA, IP

publicação trimestral _ janeiro - março

ISSN: 2183-8873 (em linha)

Observações

Boletim Epidemiológico

editorial

Qual a base da informação sobre a saúde dos Portugueses?

O primeiro número do Boletim Epidemiológico Observações foi publicado em 2012, retomando, em parte, a edição do Boletim Observações criado em setembro de 1998 e mantido até novembro de 2009 pelo Observatório Nacional de Saúde (ONSA) agora integrado no Departamento de Epidemiologia do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). Os números regulares e especiais do atual Boletim têm como principal alvo os profissionais de saúde, os investigadores, os técnicos e os decisores na área da Saúde Pública em Portugal.

Ao assumir-se como veículo de disseminação rápida da informação e cultura científica e técnica produzida pelos Departamentos do INSA, o Boletim publica informação com origem em diferentes bases amostrais, independentemente do tipo de material em questão e da unidade de investigação e análise. As amostras, probabilísticas e não probabilísticas, e a análise dos dados e da informação delas resultantes, estão subjacentes à maior parte dos artigos publicados no Boletim, o que aconselha a necessidade de uma sólida cultura de planeamento de estudos de investigação, em especial os epidemiológicos, desenho e dimensionamento de amostras estatísticas, análise de dados e extrapolação dos resultados à população em estudo e à população alvo.

Os trabalhos que utilizam dados e informação de base populacional, como os sistemas de vigilância epidemiológica e os registos de base populacional, como é o caso do rastreio neonatal, ou do sistema de vigilância diária da mortalidade, utilizam, em princípio, a totalidade dos dados e da informação, com cobertura nacional ou regional completa.

neste número

Editorial

Qual a base da informação sobre a saúde dos Portugueses?

p 01

Carlos Matias Dias (Médico especialista em Saúde Pública, Coordenador do Departamento de Epidemiologia do INSA)

Artigos Breves

Doenças Não Transmissíveis

1. Prevalência de síndrome de apneia obstrutiva do sono: um estudo da Rede Médicos-Sentinelas

p 03

Ana Paula Rodrigues, Paula Pinto, Baltazar Nunes, Cristina Bárbara

2. Modelo de crenças em saúde na decisão da toma da vacina antigripal

p 05

Ana João Santos, Irina Kislaya, Baltazar Nunes

3. European joint action sobre prevenção de doenças crónicas e promoção do envelhecimento saudável (JA-CHRODIS)

p 07

Natércia Miranda, Cláudia Niza, Luciana Costa, Astrid Moura Vicente

Doenças Infecciosas

4. Citomegalovírus: análise retrospectiva de casos suspeitos de infeção do sistema nervoso central, diagnosticados entre 2010 e 2014

p 10

Silvia Lopo, Tânia Reis, Paula Palminha, Elsa Vinagre, Cristina Furtado

5. Clostridium difficile: diversidade genética e perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos

p 15

Andrea Santos, Joana Isidro, Cláudia Júlio, Mónica Oleastro

Saúde Ambiental

6. Abordagem multidisciplinar na identificação e monitorização de cianobactérias potencialmente tóxicas

p 19

Catarina Churro, Elisabete Valério

7. Avaliação do efeito da microcistina-LR no crescimento, sistema antioxidante e indução de apoptose em Saccharomyces cerevisiae

p 23

Elisabete Valério, Arminda Vileas, Alexandre Campos, Paulo Pereira, Vitor Vasconcelos

Doenças Genéticas

8. Prevalência ao nascimento dos défices da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos na Península Ibérica

p 26

Hugo Rocha, Daisy Castiñeiras, Carmen Delgado, José Egea, Raquel Yahyaoui, Yolanda González, Manuel Conde, Inmaculada González, Inmaculada Rueda, Luis Rello, Laura Vilarinho, José Cocho

Segurança Alimentar

9. Ciclamato em adoçantes de mesa: risco de ultrapassar a dose diária admissível

p 30

Bruno Ruela Sargaço, Maria Celeste C. Serra, Elsa Reis Vasco

Notícias

Projeto Europeu ASDEU - Autism Spectrum Disorders in Europe

p 33



Um outro caso particular é o dos inquéritos de saúde de base populacional, como é o caso do Inquérito Nacional de Saúde, agora na sua 5ª edição, resultante de uma parceria entre o INSA e o Instituto Nacional de Estatística e, mais recentemente, o Inquérito Nacional e Saúde com Exame Físico (INSEF), resultante de uma parceria entre o INSA, as 7 Regiões Nacionais e o Instituto Norueguês de Saúde Pública. Estes e outros Inquéritos realizados no INSA, como o painel de famílias ECOS, estudam a saúde, a doença e a incapacidade, os fatores de risco e protetores, os determinantes de saúde e a utilização de cuidados de saúde em amostras probabilísticas da população portuguesa e são, também por isso, importantes fontes de informação epidemiológica para o planeamento, a intervenção e a avaliação em Saúde Pública.

A amostragem complexa utilizada por estes inquéritos é fundamental para, em conjunto com a máxima taxa de resposta possível, assegurar a representatividade das estimativas obtidas a nível nacional e regional.

O equilíbrio e o reconhecimento, desde a fase de planeamento da investigação, das diferenças e potencialidades de ambos os tipos de origem de dados e de informação (base não populacional e base populacional) é essencial para a correta produção e interpretação de novo conhecimento. Por um lado, porque a seleção das amostras segue percursos diferentes, com viés de seleção geralmente presente nas amostras não probabilísticas. Por outro, porque o tipo de amostragem condiciona a correta técnica de análise estatística dos dados. E, finalmente, porque a validade externa das estimativas obtidas e a capacidade de extensão dos resultados a populações mais vastas é diferente e, naturalmente, de esperar no caso das amostras probabilísticas de base populacional.

É, assim, fundamental, incluir na cultura de planeamento de qualquer investigação a consideração das diferenças e da complementaridade dos dados, informação e conhecimento obtidos a partir de estudos que utilizam amostras não probabilísticas, geralmente associadas a projetos de investigação cujo propósito inicial não é a generalização de resultados a toda uma população definida à partida e, por outro lado, a informação e o conhecimento obtidos a partir de amostras probabilísticas, selecionadas de uma base amostral e de uma população em estudo definidas de antemão.

Esta definição, *a priori*, é importante dado o seu impacto no desenho do estudo, potenciando maior eficiência na recolha e na análise dos dados, aumentando, ainda, a validade externa da informação obtida e aproximando-a da desejável intervenção em Saúde Pública em benefício das populações em estudo e das populações alvo das intervenções.

Carlos Matias Dias

Médico, Especialista em Saúde Pública,
Coordenador do Departamento de Epidemiologia do INSA



Prevalência de síndrome de apneia obstrutiva do sono: um estudo da Rede Médicos-Sentinela

Ana Paula Rodrigues¹, Paula Pinto², Baltazar Nunes¹, Cristina Bárbara²

ana.rodrigues@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Epidemiologia, INSA.

(2) Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional para as Doenças Respiratórias.

Introdução e objetivo

A síndrome de apneia obstrutiva do sono (SAOS) é caracterizada por episódios recorrentes de cessação total ou parcial do fluxo aéreo oro-nasal, secundários a um colapso da via aérea superior durante o sono.

Afeta preferencialmente indivíduos do sexo masculino, de meia-idade e obesos (1), estimando-se que a prevalência de SAOS em homens adultos varie entre 1 e 5% (2). A evidência atual aponta que a prevalência não diagnosticada possa variar entre 0,3 e 5% (3).

A importância clínica da SAOS advém das repercussões cardiovasculares (4, 5) e das alterações neuropsicológicas, sabendo-se que a terapêutica com CPAP nasal (*continuous positive airway pressure*) é eficaz na reversão das alterações neuropsicológicas e na redução dos eventos cardiovasculares associados à SAOS (6).

Em Portugal, a prevalência de SAOS não é conhecida, assim como o perfil do doente com SAOS, nomeadamente, no que se refere à gravidade, tratamento, co-morbilidades e utilização dos serviços de saúde. Este estudo tem como objetivo estimar a prevalência de SAOS com diagnóstico conhecido na população sob observação da Rede Médicos-Sentinela (MS).

Material e métodos

Estudo transversal, no qual os MS notificaram voluntariamente todos os casos com diagnóstico de SAOS das suas listas de utentes diagnosticados até 31 de dezembro de 2013 através da aplicação de um questionário estruturado para recolha de dados demográficos e antecedentes pessoais patológicos.

Calculou-se a prevalência de SAOS, e respectivo intervalo de confiança a 95% (IC 95%), desagregada por sexo e grupo etário, caracterizando-se os casos segundo o sexo, idade e antecedentes pessoais. Não foram calculadas taxas de prevalência para os grupos com menos de 5 casos.

Resultados

A prevalência de SAOS na população com 25 ou mais anos foi de 0,89% (IC 95%: 0,80-1,00%), sendo superior no sexo masculino 1,47% (IC 95%: 1,30-1,67%) e no grupo etário entre os 65 e os 74 anos (2,35%) (tabela 1). A maioria tinha SAOS grave (48,5%).

Tabela 1: Distribuição dos casos de SAOS segundo sexo e idade, prevalência e respetivo intervalo de confiança 95%.

Grupo etário (anos)	Masculino			Feminino			Total		
	Casos	%	IC 95	Casos	%	IC 95	Casos	%	IC 95
25-34	3	*	*	-	-	-	3	*	*
35-44	10	0,29	0,16-0,54	7	0,18	0,09-0,38	17	0,23	0,15-0,37
45-54	34	1,11	0,79-1,54	14	0,41	0,24-0,69	48	0,74	0,56-0,98
55-64	73	2,68	2,14-3,36	16	0,51	0,32-0,83	89	1,52	1,24-1,87
65-74	88	4,02	3,28-4,93	24	0,93	0,63-1,38	112	2,35	1,95-2,82
≥ 75	29	1,71	1,19-2,44	13	0,48	0,28-0,82	42	0,95	0,71-1,28
Total	237	1,07	0,95-1,22	74	0,30	0,24-0,38	311	0,67	0,60-0,74
≥ 25	237	1,47	1,30-1,67	74	0,39	0,31-0,49	311	0,89	0,80-1,00

* Valores não calculados por o número de casos ser inferior a 5

(-) sem registo de casos



artigos breves_ n. 1

Discussão

Observou-se uma prevalência menor do que a estimada noutros países (7-9) o que pode relacionar-se com as diferentes metodologias usadas, nomeadamente, no que respeita à base amostral, grupos etários, seleção de participantes e definição de caso. No entanto, tendo em conta a elevada proporção de casos graves, coloca-se a hipótese, à semelhança do que ocorre noutros países (3), do subdiagnóstico deste problema, em particular das situações de menor gravidade o que limita a possibilidade de atuação e tratamento precoce.

A obesidade (84,6%), hipertensão arterial (74,8%) e diabetes *mellitus* (38,7%) foram as co-morbilidades mais frequentes nestes doentes.

Agradecimentos

A todos os Médicos-Sentinela que participaram na recolha de dados.
À Inês Batista pelo apoio na recolha de dados.

Referências bibliográficas:

- (1) Chung F, Subramanyam R, Liao P, et al. High STOP_BANG score indicates a high probability of obstructive sleep apnea. *Br J Anaesth*. 2012;108:768-75. [LINK](#)
- (2) Davies RJ, Stradling JR. The epidemiology of sleep apnoea. *Thorax*. 1996;51(Suppl 2):S65-70. [LINK](#)
- (3) Lindberg E, Gislason T. Epidemiology of sleep-related obstructive breathing. *Sleep Med Rev*. 2000;4(5):411-33.
- (4) Lopez-Jimenez F, Sert Kunyoshi FH, Gami A, et al. Obstructive sleep apnea: implications for cardiac and vascular disease. *Chest*. 2008;133(3):793-804. [LINK](#)
- (5) Shahar E, Whitney CW, Redline S, et al. Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(1):19-25. [LINK](#)
- (6) Pinto P, Bárbara C, Montserrat JM, et al. Effects of CPAP on nitrate and norepinephrine levels in severe and mild-moderate sleep apnea. *BMC Pulm Med*. 2013;13:13. [LINK](#)
- (7) Young T, Palta M, Dempsey J, et al. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med*. 1993;328(17):1230-5. [LINK](#)
- (8) Bixler EO, Vgontzas AN, Ten Have T, et al. Effects of age on sleep apnea in men: I. Prevalence and severity. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(1):144-8. [LINK](#)
- (9) Durán J, Esnaola S, Rubio R, et al. Obstructive sleep apnea-hypopnea and related clinical features in a population-based sample of subjects aged 30 to 70 yr. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(3 Pt 1):685-9. [LINK](#)



Modelo de crenças em saúde na decisão da toma da vacina antigripal

Ana João Santos, Irina Kislaya, Baltazar Nunes

ana.carvalho@insa.min-saude.pt

Departamento de Epidemiologia, INSA.

Introdução

A vacina antigripal sazonal (VAG) é a principal medida de proteção contra a gripe e complicações associadas. A Direção-Geral da Saúde (DGS) emite anualmente recomendações para a prescrição da vacina antigripal gratuita a grupos-alvo prioritários, incluindo pessoas com idade igual ou superior a 65 anos e doentes crónicos (1). Apesar de se ter vindo a observar um aumento da cobertura VAGS nesta população nas épocas pós gratuidade (estimativa ECOS, 49,9% [IC95% 41,5 a 58,2]), a cobertura mantém-se abaixo da meta recomendada pela DGS para a época 2013-14 (60%) (2).

O Modelo de Crenças de Saúde (MCS), desenvolvido nos anos 50, tem sido utilizado como um método sistemático para explicar e prever comportamentos preventivos de saúde, nomeadamente, no processo de tomada de decisão na toma ou não da VAG (3). Inclui 5 domínios-chave que influenciam comportamentos de saúde: vulnerabilidade percebida, severidade percebida, benefícios percebidos, barreiras percebidas e pistas para a ação.

Objetivo

O estudo desenvolvido no âmbito do ECOS (Em casa observamos Saúde) (4) teve como principal objetivo avaliar a auto percepção das dimensões do MCS (gravidade, suscetibilidade, barreiras e benefícios) na adesão à VAG por indivíduos pertencentes ao grupo-alvo.

Materiais e métodos

Os dados foram obtidos através de um inquérito telefónico a uma amostra de unidade de alojamento (Amostra ECOS). A amostra de indivíduos com 18+ anos residentes nas unidades de alojamento em Portugal Continental é aleatória, estratificada por região com alocação homogénea (n=856). Os dados foram recolhidos através

de um questionário estruturado via entrevista telefónica assistida por computador (dezembro de 2013). As estimativas foram ponderadas por grupo etário e região.

O grupo-alvo foi definido como pessoas com idade igual ou superior a 65 anos e/ou pessoas com uma das seguintes doenças crónicas (auto reportadas): asma; doença pulmonar obstrutiva crónica (bronquite crónica, enfisema pulmonar); diabetes; obesidade; doença isquémica cardíaca (doença coronária, angina de peito); doença hepática e doença renal.

Resultados

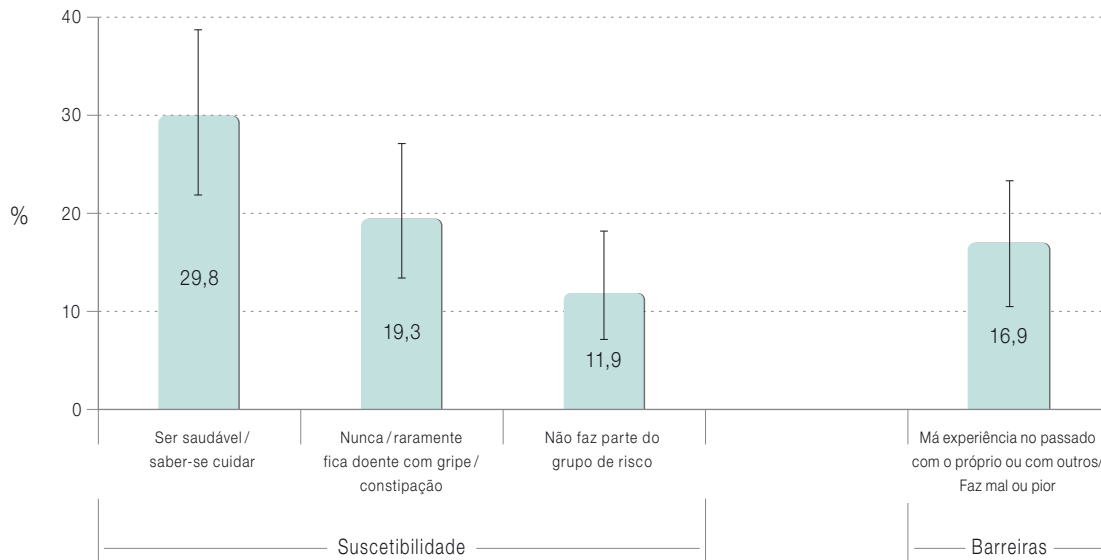
Cerca de dois terços da população (68,7%) do grupo-alvo não tomou a VAG na época 2013/2014.

Questionaram-se, numa pergunta aberta, os participantes do grupo-alvo que não se vacinaram sobre as razões que os levaram a tomar essa decisão. Categorizaram-se as respostas em categorias distribuídas pelas cinco dimensões que constituem o MCS.

De acordo com o gráfico 1, os principais motivos evocados, pelo grupo-alvo, inserem-se na dimensão suscetibilidade, que se refere ao julgamento do indivíduo sobre as probabilidades de contrair a doença. As categorias desta dimensão mais frequentemente referidas são o “considerar-se uma pessoa saudável” e o “saber-se cuidar” (29,8%), das quais são exemplos as seguintes respostas abertas: “tomo vitamina C das laranjas e nunca tenho gripe” e “sou uma pessoa saudável”. Seguiram-se as respostas da categoria “Nunca/raramente fica doente com gripe/constipação” (19,3%).

A terceira categoria mais frequente insere-se na dimensão barreiras percebidas do MCS. Corresponde à avaliação individual sobre os obstáculos ou dificuldades na adoção de um determinado comportamento e foi a segunda dimensão do MCS mais relevante. Cerca de 17% afirmou não tomar a vacina por ter tido uma má experiência no passado, por conhecer alguém que teve uma má experiência ou ainda pela noção de que a VAG faz mal ou pior que a gripe. Nesta categoria são exemplos de respostas abertas: “da última vez que me vacinei fiquei muito mal” e “tive familiares que já se vacinaram e morreram pouco tempo depois, uma delas diabética”.

Gráfico 1: ↘ Frequência dos motivos para a não vacinação.



Ainda na dimensão suscetibilidade, enquadram-se também aqueles que afirmaram não tomar a VAG por “não pertencer ao grupo de risco” (11,9%). Nesta categoria, encontramos respostas associadas ao grupo etário, como por exemplo, “acho que não sou uma pessoa de risco devido a não ser idosa”.

_Discussão e conclusão

As dimensões suscetibilidade e barreiras percebidas são as dimensões mais evocadas para a não toma da vacina antigripal, o que vai ao encontro de alguns estudos sobre o MCS aplicado aos comportamentos preventivos (5). As campanhas de vacinação poderão potenciar a sua efetividade se tomarem em consideração os fatores que são mais relevantes para a população na sua tomada de decisão.

Referências bibliográficas:

- (1) Direção-Geral da Saúde. Orientação nº 013/2012, de 21/09/2012. Vacinação contra a gripe com a vacina trivalente para a época 2012/2013. [LINK](#)
- (2) Nunes B, Uva MS, Roquette R, et al. Vacinação antigripal da população portuguesa na época 2013-2014: estudo na amostra ECOS. Relatório. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2014. [LINK](#)
- (3) Chapman GB, Coups EJ. Predictors of influenza vaccine acceptance among healthy adults. *Prev Med.* 1999;29(4):249-62.
- (4) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Observatório Nacional de Saúde. Em casa, pelo telefone, observamos saúde: descrição e avaliação de uma metodologia. Lisboa: INSA, 2010.
- (5) Champion VL, Skinner CS. The health belief model. In: Glanz K, Rimer BK, Viswanath K (eds). *Health behavior and health education: theory, research, and practice.* 4rd ed. San Francisco: Jossey-Bass, 2008. p. 42-65.



European joint action sobre prevenção de doenças crónicas e promoção do envelhecimento saudável (JA-CHRODIS)

Natércia Miranda, Claudia Niza, Luciana Costa,
Astrid Moura Vicente

astrid.vicente@insa.min-saude.pt

Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, INSA.

O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) é uma das instituições participantes na JA-CHRODIS - Joint Action on Chronic Diseases and Promoting Healthy Ageing Across the Life Cycle (<http://www.chrodis.eu/>) sobre a prevenção de doenças crónicas e promoção do envelhecimento saudável na população europeia ao longo do ciclo de vida. A JA-CHRODIS propõe-se identificar, validar e promover o intercâmbio e a difusão de boas práticas no campo das doenças crónicas (em particular doenças cardiovasculares [DCV] e diabetes tipo 2), visando facilitar a sua adoção para além das fronteiras locais, regionais e nacionais. Tem como foco a promoção da saúde, a prevenção primária, a gestão da doença e da multimorbilidade.

É um projeto com a duração de três anos (2014-2017) liderado pelo Instituto de Saúde Carlos III e que reúne 66 parceiros associados e colaboradores de 26 países, co-financiado pelos Estados-Membros e Comissão Europeia. As entidades participantes provêm de diversas áreas, incluindo instituições de administração estratégica e de investigação saúde. Em Portugal, são entidades parceiras associadas o INSA e a Direção-Geral da Saúde (DGS), contando-se outras duas entidades nacionais com o estatuto de colaboradoras, a Associação Protetora dos Diabéticos de Portugal (APDP) e a Universidade de Coimbra (Faculdade de Medicina) em nome do consórcio Ageing@Coimbra.

Porquê a JA-CHRODIS

As doenças crónicas como as DCV e a diabetes tipo 2 afetam 8 em cada 10 pessoas com mais de 65 anos na Europa. Cerca de 70% a 80% do orçamento de saúde em toda a UE é gasto no tratamento da doença crónica. Este investimento espelha o facto de

as DCV e diabetes representarem a principal causa de morte na Europa (1, 2), incluindo o nosso país (2-5) e uma importante causa de incapacidade. No caso da diabetes tipo 2, a mortalidade em Portugal é superior à média dos países da EU (4).

A maior parte das DCV e a diabetes tipo 2 estão relacionadas com determinantes modificáveis em que se incluem o estilo de vida e diversos fatores de risco (1). O seu controlo é, como se sabe, essencial para a redução das complicações fatais e não fatais daquelas doenças de grande magnitude e transcendência económica e social.

Existe hoje uma grande riqueza de conhecimento e de experiência nos Estados-Membros da UE no que se refere a formas eficazes e efectivas de prevenir e controlar a DCV, o acidente vascular cerebral (AVC) e a diabetes tipo 2, com um enorme potencial para a redução da carga de doença e para estabelecer estratégias de prevenção bem-sucedidas. A JA-CHRODIS foi concebida para explorar este potencial. Os parceiros trabalham em conjunto, tal como acima referido, para identificar, validar, promover o intercâmbio e a difusão das boas práticas em matéria de doenças crónicas nos Estados-Membros da UE e para facilitar a sua adoção por responsáveis de saúde em diversas regiões e países. Um dos objetivos fundamentais é o desenvolvimento de uma "plataforma para o intercâmbio do conhecimento" (PKE), proporcionando um repositório atualizado do conhecimento mais avançado e das melhores práticas sobre doenças crónicas.

Participação do INSA

O INSA participa em duas áreas de trabalho específicas dentro das várias atividades do CHRODIS (<http://www.chrodis.eu/our-work/>): 1) no desenvolvimento da Plataforma sobre as doenças crónicas na Europa (Workpackage 4); e 2) no estabelecimento de critérios de inclusão para a inscrição de boas práticas na plataforma (Workpackage 5). Nesta atividade está incluída a definição de critérios específicos para a avaliação de boas práticas em promoção da saúde e prevenção da doença crónica e a identificação de boas práticas já existentes e que importa disseminar. Isso envolve a análise e validação de estratégias de promoção da saúde e de prevenção primária de DCV, AVC, diabetes tipo 2 e de fatores de risco modificáveis individuais e sociais. Esta tarefa não só tem

em conta os estilos de vida e os comportamentos relacionados com a saúde, mas também os determinantes sociais e económicos mais amplos que os influenciam.

No âmbito das atividades do WP5, todos os países participantes foram convidados a redigir um relatório síntese que oferecesse uma visão global das intervenções em promoção da saúde e prevenção primária realizadas no respetivo território respeitantes a DCV, AVC e diabetes tipo 2. Os relatórios tiveram como objetivo identificar políticas, mecanismos de implementação, projetos nacionais e locais considerados boa prática, estudos de previsão e de custo-efetividade realizados sobre estes temas. Pretendeu-se também identificar lacunas de intervenção em promoção da saúde e prevenção primária em cada país. Os relatórios de todos os países envolvidos, incluindo o relatório de Portugal elaborado pelo INSA em colaboração com a DGS e a APDP desenvolvidos no primeiro ano de execução do projeto foram apresentados em Bruxelas dia 19 e 20 de fevereiro e encontram-se disponíveis no website da JA-CHRODIS (6).

Este relatório português reúne informação sobre o cenário e o estado atual da promoção da saúde e prevenção das doenças crónicas em Portugal no que respeita à sua implementação a nível nacional, regional ou local. Neste âmbito, foram identificadas as instituições e organizações com uma participação mais relevante, para além dos programas e das estratégias mais significativas neste domínio.

Dada a inexistência de bases de dados estruturadas de boas práticas em promoção da saúde para a população portuguesa, destacou-se o facto de que a identificação de projetos de qualidade neste âmbito se encontrar essencialmente ligada à aplicação dos critérios definidos para financiamento por instituições públicas ou privadas, que avaliam a sua qualidade e exequibilidade.

Em relação à existência de estudos com impacto na temática da promoção da saúde foram assinalados alguns projetos com relevância para a população portuguesa, nomeadamente o PRE-VADIAB 2 (“Prevalence Study follow-up in diabetes”) (7-9), o e_COR (“Prevalência de fatores de risco cardiovascular na população portuguesa”) (10), o LADIES study (“Leukoaraiosis and

disability study”) (11) e o EPHF (“Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar”) (12), entre outros.

Apesar das recomendações claras do Plano Nacional de Saúde e dos programas nacionais das DCV e Diabetes, é notória a escassez de investigação na área dos estudos de custo-efetividade de programas de boas práticas em promoção da saúde, sendo referido o estudo EUROTRCS (<http://ispup.up.pt/research/epiunit/research-projects/330/>) como um dos poucos exemplos neste domínio.

É de assinalar ainda a necessidade de melhorar a interação entre os setores públicos e a sociedade civil como forma de potenciar a capacitação no domínio da promoção da saúde e prevenção primária da população portuguesa.

O estabelecimento dos critérios de inclusão para projetos de boas práticas em promoção da saúde e prevenção primária está ainda em curso, sendo possíveis propostas de atividades em curso em Portugal algumas iniciativas com enfoque no exercício físico (Portuguese National Walking and Running Program) (13) e a nutrição (“Health Ageing with Innovative Functional Foods/Needs for degenerative and metabolic diseases” /INOAFUNAGEING e “Bioactive Natural Food Ingredients for aging-people functional diet”/ NutriBioFun) (13), entre outras.

Através da JA-CHRODIS pretende-se, assim, conseguir a promoção do intercâmbio, a ampliação e a transferência de práticas de promoção da saúde e de prevenção primária altamente promissoras, rentáveis e inovadoras para populações mais idosas, designadamente acima de 65 anos.

Referências bibliográficas:

- (1) Nichols M, Townsend N, Scarborough P, et al. Trends in age-specific coronary heart disease mortality in the European Union over three decades: 1980-2009. *Eur Heart J*. 2013;34(39):3017-27. [LINK](#)
- (2) Tamayo T, Rosenbauer J, Wild SH, et al. Diabetes in Europe: an update. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;103(2):206-17. Epub 2013 Dec 1.
- (3) Cortez-Dias N, Martins S, Belo A, et al. Prevalência, tratamento e controlo da diabetes mellitus e dos factores de risco associados nos cuidados de saúde primários em Portugal. *Rev Port Cardiol*. 2010; 29(4):509-37. [LINK](#)
- (4) Monteiro P, Monteiro S, Gonçalves F, et al. Diabetes e síndromes coronárias agudas: uma abordagem prática. *Rev Port Cardiol*. 2013;32(suppl 1):44-8. [LINK](#)



artigos breves_ n. 3

- (5) Ribeiro S, Furtado C, Pereira, J. Associação entre as doenças cardiovasculares e o nível socioeconómico em Portugal. Rev Port Cardiol. 2013;32(11): 847-54. [LINK](#)
- (6) Directorate-General of Health, Health Institute Doutor Ricardo Jorge, IP Portugal. Joint Action on Chronic Diseases and Promoting Healthy Ageing Across the Life Cycle - Good Practice in the Field of Health Promotion and Primary Prevention: Portugal Country Review. Brussels: European Union, 2015. [LINK](#)
- (7) Gardete-Correia L, Boavida JM, Raposo JF, et al. First diabetes prevalence study in Portugal: PREVADIAB study. Diabet Med. 2010;27(8):879-81.
- (8) Sociedade Portuguesa de Diabetologia. Diabetes: factos e números 2014: relatório anual do Observatório Nacional da Diabetes. Lisboa: SPDD, 2014. [LINK](#)
- (9) European innovation partnership on active and healthy ageing-Action Group B3. Replicating and tutoring integrated care for chronic diseases, including remote monitoring at regional level: a compilation of good practices. 2nd ed. Bruxelles: European Commission, 2013. [LINK](#)
- (10) Alves AC, Siopa M, Rato Q, et al. Novos dados sobre os fatores de risco em Portugal - resultados preliminares do Estudo e_COR (3 regiões). Anamnesis. 2014;23(217):20-21.
- (11) Verdelho A, Madureira S, Ferro JM, et al.; LADIS Study. Physical activity prevents progression for cognitive impairment and vascular dementia: results from the LADIS (Leukoaraiosis and Disability) study. Stroke. 2012;43(12):3331-5. [LINK](#)
- (12) Medeiros AM, Alves AC, Francisco V, et al.; investigators of the Portuguese FH Study. Update of the Portuguese Familial Hypercholesterolaemia Study. Atherosclerosis. 2010;212(2):553-8.
- (13) European innovation partnership on active and healthy ageing-Action Group B3. Prevention and Early Diagnosis of Frailty and Functional Decline, Both Physical and Cognitive, in Older People: a compilation of good practices. 1st ed. Bruxelles: European Commission, 2013. [LINK](#)



Citomegalovírus: análise retrospectiva de casos suspeitos de infeção do sistema nervoso central diagnosticados entre 2010 e 2014

Sílvia Lopo, Tânia Reis, Paula Palminha, Elsa Vinagre, Cristina Furtado

silvia.lopo@insa.min-saude.pt

Departamento de Doenças Infeciosas, INSA.

_Introdução

O Citomegalovírus (CMV) é um vírus ubíquo pertencente à família *Herpesviridae*. A infeção pelo CMV é altamente prevalente em todo o mundo, com taxas de seropositividade que variam entre 40% e 100% na população adulta (1). Em Portugal, e de acordo com os resultados do Segundo Inquérito Serológico Nacional – 2001/2002, a seroprevalência para o CMV foi em média de 77%, variando entre 66,5% no grupo etário 2-4 anos e 95,6% nos indivíduos acima dos 65 anos (2).

As infeções pelo CMV são na sua maioria assintomáticas. As manifestações de doença dependem da idade da aquisição da infeção e das alterações do estado imunitário dos indivíduos e apresentam um quadro clínico que pode ser ligeiro e autolimitado ou dar origem a complicações graves e até mesmo fatais.

O CMV é um vírus neurotrópico associado muitas vezes a complicações neurológicas graves, em particular nos doentes imunocomprometidos, uma vez que a terapêutica imunossupressora facilita o aparecimento de infeções oportunistas, predispondo a uma infeção primária ou à reativação do vírus latente (3).

O diagnóstico baseado no quadro clínico é dificultado pelo facto de outros agentes biológicos poderem estar também implicados na etiologia das infeções do sistema nervoso central (SNC), pelo que deve considerar-se, como complemento, o diagnóstico laboratorial e/ou imagiológico.

O diagnóstico laboratorial de eleição para pesquisa do CMV no líquido céfalo-raquidiano (LCR) é o PCR em tempo real, uma vez que

é um método molecular que apresenta um intervalo linear alargado, um limite de deteção e quantificação de pequeno número de cópias do amplificado e um risco reduzido de contaminação, pelo facto dos processos de amplificação e deteção serem efetuados em sistema fechado (4).

A análise quantitativa da carga viral do CMV por PCR em tempo real tem contribuído para a melhoria do diagnóstico de infeção ativa e para o seu tratamento, permitindo monitorizar a resposta à terapêutica e, consequentemente, determinar a sua efetividade, particularmente nas infeções do sistema nervoso central (5, 6).

_Objetivos

Este estudo tem como objetivo descrever as características demográficas e o quadro clínico e imunitário de doentes com suspeita de infeção viral neurotrópica e analisar a frequência das infeções por CMV nas patologias do SNC, cujo diagnóstico foi confirmado no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre janeiro de 2010 e abril de 2014.

_Material e métodos

Foi realizada uma análise retrospectiva das amostras de LCR de 1790 doentes com suspeita de infeção viral no SNC, recebidas no Departamento de Doenças Infeciosas do INSA, entre janeiro de 2010 e abril de 2014, para pesquisa e quantificação de DNA do CMV por PCR em tempo real.

A extração do DNA foi efetuada em equipamento automatizado de extração de ácidos nucleicos (*Nuclisens EasyMag – Biomerieux*) e a amplificação, deteção e quantificação do DNA do CMV foi realizada utilizando um dispositivo comercial de PCR em tempo real, que amplifica uma região do exão 4 do gene imediatamente precoce (MIE) HCMVUL123 (*Q-CMV RT Kit, ELITEch Group*). A técnica inclui também um controlo interno de inibição, com *primers* específicos para a região promotora e região 5'UTR do gene da beta globina humana. O PCR em tempo real foi efetuado na plataforma de amplificação ABI PRISM 7500 (*Applied Biosystem*). Os resultados positivos foram quantificados em cópias/ml, tendo em consideração o volume de amostra extraída, o volume final de eluição e o volume de DNA utilizado na reação de amplificação.

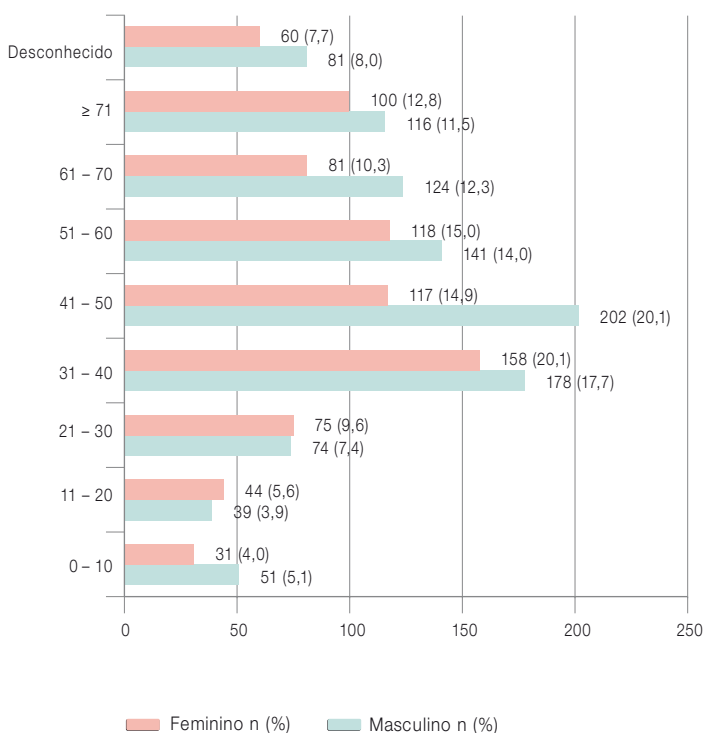
artigos breves_ n. 4

Para a análise descritiva dos dados demográficos dos casos suspeitos e confirmados, recorreu-se ao cálculo de frequências absolutas e relativa. Para comparar a frequência de distribuição da infeção por CMV e o estado imunitário, aplicou-se o teste exato de Fisher. Para todos os testes estatísticos foi considerado um nível de significância de 5%.

Resultados

Dos 1790 doentes suspeitos de infeção viral no SNC, 1006 (56,2%) pertenciam ao género masculino e 784 casos (43,8%) ao género feminino. A idade destes doentes variou entre os 29 dias de vida e os 85 anos, sendo a mediana de 46 anos. No gráfico 1 apresenta-se a distribuição dos 1790 casos suspeitos de infeção neurotrópica por género e grupo etário.

Gráfico 1: Distribuição dos 1790 casos suspeitos de infeção viral neurotrópica por género e grupo etário, 2010-2014.*



* janeiro 2010 - abril 2014

Foi possível conhecer o estado imunitário em 1758 dos doentes em análise, dos quais 1215 (69,1%) eram imunocompetentes e 543 (30,9%) imunocomprometidos. Na tabela 1 consta a distribuição do quadro clínico, sinais e/ou sintomas que levaram à suspeita de infeção viral neurotrópica dos 1758 doentes cujo estado imunitário foi conhecido.

Tabela 1: Distribuição dos 1758 casos suspeitos de infeção viral neurotrópica em função do quadro clínico, sinais/sintomas de doença e estado imunitário, 2010-2014.*

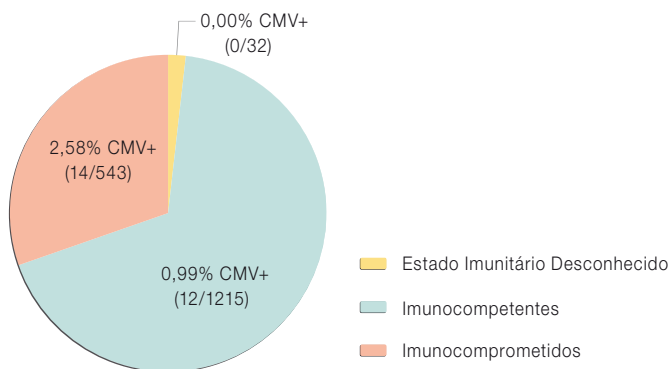
Quadro clínico, Sinais / Sintomas de doença	Indivíduos Imunocompetentes n = 1215	Indivíduos imunocomprometidos n = 543
Suspeita de infeção viral neurotrópica	170	103
Lesão ocupando espaço (LOE)	42	65
Patologias inespecíficas do Sistema Nervoso Central	18	10
Síndrome demencial / Alteração de comportamento	88	84
Ataxia	17	7
Convulsões / Epilepsia	30	12
Encefalite / Meningite / Meningoencefalite	352	111
Mielite / Encefalomielite	71	9
Esclerose múltipla	38	3
Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (LEMP)	4	29
Nevrite ótica	37	0
Síndrome de Guillain-Barré	19	0
Neuropatia / Polineuropatia	45	15
Doença desmielinizante	49	4
Vasculopatia	11	2
Paralisia Facial	14	2
Paraparesia / Tetraparesia	47	6
Diplopia / Afasia	14	1
Síndrome febril indeterminado	84	45
Cefaleias / Prostração	36	21
Infeção respiratória + febre / Pneumonia	7	5
Tumor / Linfoma	1	4
Acidente vascular cerebral	18	3
Coma	3	2
Total	1215	543

* janeiro 2010 - abril 2014

artigos breves_ n. 4

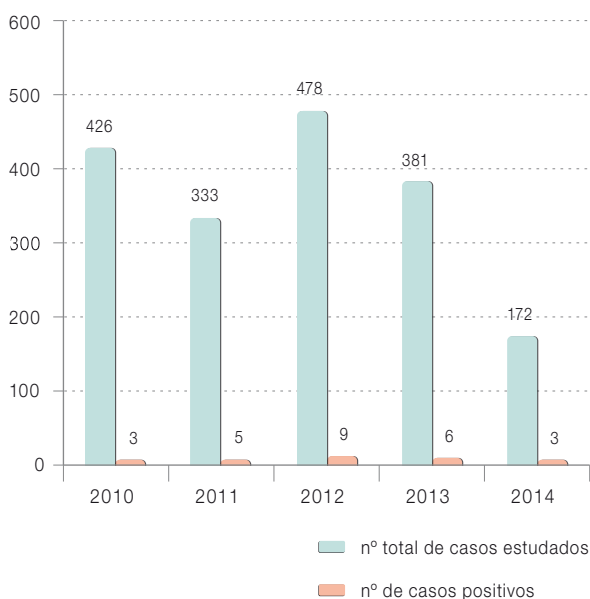
Dos 1790 doentes estudados entre janeiro de 2010 e abril de 2014, 26 (1,5%) foram confirmados como casos positivos de infeção por CMV por PCR em tempo real (gráficos 2 e 3). Dos 1764 doentes suspeitos em que a pesquisa de DNA do CMV foi negativa, 139 (7,9%) foram positivos para outros vírus neurotrópicos (vírus herpes simplex do tipo 1, vírus herpes simplex do tipo 2, vírus varicela-zoster, vírus Epstein Barr, vírus herpes humano tipo 6, vírus herpes humano tipo 7, parvovírus B19, enterovirus, adenovirus e vírus JC).

Gráfico 2: Distribuição dos 1790 casos suspeitos de infeção viral neurotrópica por infeção CMV e estado imunitário, 2010-2014.*



* janeiro 2010 - abril 2014

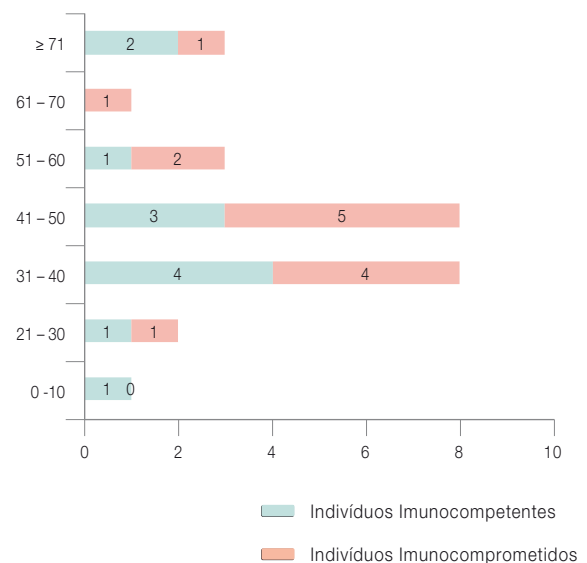
Gráfico 3: Distribuição dos casos de infeção por CMV por ano de diagnóstico, 2010-2014.*



* janeiro 2010 - abril 2014

Em relação ao estado imunitário e idade dos casos positivos para CMV, 14 (53,8%) eram indivíduos imunocomprometidos com idades compreendidas entre os 30 e os 72 anos e 12 (46,2%) eram indivíduos imunocompetentes entre os 27 e os 81 anos, à exceção de um caso ocorrido numa criança imunocompetente, com 1 ano de idade (gráfico 4).

Gráfico 4: Distribuição dos 26 casos de infeção por CMV por grupo etário e estado imunitário, 2010-2014.*



* janeiro 2010 - abril 2014

Quanto à distribuição dos casos de infeção por CMV em função do quadro clínico, sinais/sintomas, observaram-se 15 casos com alterações de comportamento associadas a alterações imagiológicas (6 casos), síndrome febril (6 casos) e convulsões (3 casos); encefalite (5 casos), meningite (2 casos), imunossupressão grave com síndrome febril (2 casos), epilepsia (1 caso) e coma (1 caso) (tabela 2).

Os valores de carga viral do CMV variaram entre 28 e 470 cópias/ml em doentes imunocompetentes e entre 57 e 4965 cópias/ml em indivíduos imunocomprometidos.



Tabela 2: ↓ Distribuição dos 26 casos de infeção por CMV em função do quadro clínico, sinais/sintomas de doença e estado imunitário, 2010-2014.*

Quadro clínico, Sinais / Sintomas de doença	Estado Imunitário n=26	
	Indivíduos Imunocompetentes n = 12	Indivíduos imunocomprometidos n = 14
LOE + Alteração de comportamento	2	4
Febre + Alteração de comportamento	3	3
Convulsões + Alteração de comportamento	2	1
Encefalite	3	2
Meningite	1	1
Imunossupressão grave + febre	0	2
Epilepsia	1	0
Coma	0	1

* janeiro 2010 - abril 2014

p (teste exato de Fisher) = 0.0107

Discussão e conclusões

Dos 1790 indivíduos com suspeita de infeção viral neurotrópica, observou-se que o diagnóstico de encefalite, meningite, meningoencefalite, convulsões, alterações de comportamento e síndrome febril indeterminado foram os quadros clínicos, sinais/sintomas mais frequentes quer nos indivíduos imunocompetentes, quer nos imunocomprometidos. No entanto, e com menor frequência, a suspeita de infeção no SNC encontrou-se também relacionada com manifestações variadas, de acordo com o descrito na **tabela 1**.

Os resultados confirmaram 26 (1,5%) casos de infeção por CMV nos 1790 doentes estudados, entre janeiro de 2010 e abril de 2014. As alterações de comportamento associadas a alterações imagiológicas, síndrome febril, convulsões e encefalites foram as patologias predominantes nos casos positivos para CMV, apesar das patologias que ocorreram com menor frequência também estarem descritas na literatura **(1,7)**.

Neste estudo encontrou-se uma diferença significativa entre a frequência de infeção por CMV no SNC e o estado imunitário dos indivíduos, com maior frequência de infeções por CMV nos indivíduos imunocomprometidos ($p=0.0107$) (**gráfico 2**). O CMV é considerado um dos mais importantes vírus oportunistas em indivíduos imu-

nocomprometidos, uma vez que o sistema homeostático sofre de-sequilíbrios que conduzem à imunossupressão, favorecendo assim a replicação viral.

Neste estudo foram encontrados valores de carga viral do CMV mais elevados nos indivíduos imunocomprometidos, nomeadamente valores superiores a 1000 cópias/ml nos indivíduos com imunossupressão grave (contagem de linfócitos CD4+ com valores inferiores a 100 células/mm³) logo, com um risco acrescido do aparecimento de co-infeções e doença. Este facto alerta para a importância da análise sistemática dos valores de carga viral para avaliar a gravidade da doença e monitorizar a terapêutica antiviral **(4)**.

Desde a introdução da terapêutica anti-retroviral HAART nos indivíduos infetados pelo vírus VIH, que permite restabelecer os linfócitos CD4+, tem havido uma redução da incidência de infeção oportunista por CMV nestes indivíduos e um controle mais eficaz da progressão da doença. No entanto, e apesar das infeções pelo CMV no SNC continuarem associadas a infeções oportunistas nos indivíduos imunocomprometidos, a literatura refere a possibilidade da infeção por CMV no SNC estar subestimada nos indivíduos imunocompetentes **(8)**.

Tendo em conta que a infeção pelo CMV no SNC manifesta-se frequentemente por patologias não específicas que podem estar associadas a infeções causadas por outros vírus, é necessário garantir a validade do diagnóstico laboratorial. Neste sentido, o PCR em tempo real no LCR é o método molecular preferencial, quer pela sua elevada sensibilidade e especificidade, quer pelo risco reduzido de contaminação e capacidade de quantificação da carga viral **(1,4,8)**.

A deteção e quantificação por PCR em tempo real no LCR sugerem uma infeção ativa pelo CMV, contribuindo substancialmente para o diagnóstico e consequente tratamento das infeções do SNC. No entanto, os resultados positivos deverão ser interpretados de acordo com o contexto individual de cada doente, em especial nos casos de baixa carga viral por CMV, como responsável de patologia neurotrópica **(4,5,8)**. Contudo, saliente-se que as metodologias quantitativas de PCR em tempo real específicas para um vírus, são



artigos breves_ n. 4

desenhadas de forma a amplificar zonas altamente conservadas, não permitindo reação cruzada com outros vírus, pelo que, um resultado positivo para CMV, mesmo com baixa carga viral, reflete infeção ou reativação por este vírus (4).

Agradecimento

Os autores agradecem à dra. Zilda Mendes pela revisão estatística do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Griffiths P. Cytomegalovirus infection of the central nervous system. *Herpes*. 2004;11(Suppl 2):95A-104A.
- (2) Lopo S, Vinagre E, Palminha P. Vírus Citomegalo. In: Direção-Geral da Saúde. Avaliação do Programa Nacional de Vacinação. 2º Inquérito Serológico Nacional – Portugal Continental 2001/2002. Lisboa: DGS, 2004. pp.101-11. [LINK](#)
- (3) Pass R. Cytomegalovirus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al. (eds). *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 2675-2705.
- (4) Gaeta A, Verzaro S, Cristina LM, et al. Diagnosis of neurological herpesvirus infections: real time PCR in cerebral spinal fluid analysis. *New Microbiol*. 2009;32(4):333-40. [LINK](#)
- (5) Kraft CS, Armstrong WS, Caliendo AM. Interpreting quantitative cytomegalovirus DNA testing: understanding the laboratory perspective. *Clin Infect Dis*. 2012; 54(12):1793-7. [LINK](#)
- (6) Whitley R. Herpesvirus Infections of the Central Nervous System. *Herpes*. 2004;11(2):47A-56A.
- (7) Quereda C, Corral I, Laguna F, et al. Diagnostic utility of a multiplex herpesvirus PCR assay performed with cerebrospinal fluid from human immunodeficiency virus-infected patients with neurological disorders. *J Clin Microbiol*. 2000;38(8):3061-7. [LINK](#)
- (8) Mendoza LP, Bronzoni RV, Takayanagui OM, et al. Viral infections of the central nervous system in Brazil. *J Infect*. 2007;54(6):589-96.



***Clostridium difficile*: diversidade genética e perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos**

Andrea Santos, Joana Isidro, Cláudia Júlio, Mónica Oleastro

monica.oleastro@insa.min-saude.pt

Laboratório Nacional de Infecções Gastrointestinais.
Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

_Introdução

A infeção por *Clostridium difficile* é descrita como a principal causa de diarreia relacionada com a prestação de cuidados de saúde em países desenvolvidos (1). As manifestações clínicas da doença são variadas e vão desde a diarreia ligeira a complicações graves e muitas vezes fatais, como é exemplo a colite pseudomembranosa (2). A infeção por *C. difficile* está diretamente associada à toma recente de antibióticos, que desequilibram a flora intestinal, criando assim condições favoráveis à multiplicação desta bactéria toxigenética.

Em 2004 surgiu um novo tipo genético (ribotipo) de *C. difficile*, o ribotipo 027, caracterizado pela elevada resistência às fluoroquinolonas, e que foi responsável por inúmeros surtos em vários países europeus, incluindo Portugal (3, 4).

Para além do ambiente hospitalar, *C. difficile* tem sido isolado de amostras provenientes de animais domésticos, colonizados ou infetados, e em produtos alimentares de origem animal (5). Estirpes geneticamente semelhantes a estas foram também isoladas no homem, nomeadamente os ribotipos 078, 014 e 001 (5).

A virulência da bactéria *C. difficile* é mediada pela produção em simultâneo de duas toxinas, a enterotoxina A e a citotoxina B, ambas codificadas por genes do locus de patogenicidade e cuja expressão é regulada pelo gene *tcdC*. Polimorfismos neste gene estão associadas a maiores níveis de produção de toxinas (6). Para além destas duas toxinas, algumas estirpes produzem a toxina binária, cuja função ainda não está totalmente estabelecida, mas que parece promover a adesão da bactéria às células do cólon (7).

A terapia antimicrobiana utilizada no tratamento desta infeção bacteriana tem-se mantido praticamente inalterada, sendo o metronidazol e a vancomicina os antibióticos de primeira linha, com a vancomicina como primeira escolha nos casos mais graves (2).

_Objetivo

Este trabalho teve como objetivo estudar a variabilidade genética e o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de estirpes de *C. difficile* recebidas no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre julho de 2012 e dezembro de 2014.

_Materiais e métodos

Participaram no estudo 19 hospitais distribuídos pelas 5 regiões de Portugal Continental, que enviaram ao INSA amostras de fezes ou estirpes de *C. difficile* isoladas de doentes internados, com um quadro clínico de diarreia.

As estirpes foram caracterizadas a nível molecular relativamente à presença dos genes das toxinas A, B e binária, presença de mutações no gene regulador das toxinas (*tcdC*) e ribotipo. Foi também avaliada a presença do gene *ermB*, marcador da resistência aos MLS_B, macrólidos, lincosamidas e estreptograminas do tipo B.

A suscetibilidade aos antimicrobianos foi testada por E-test para a moxifloxacina, vancomicina, metronidazol e imipenem, sendo definida por concentrações mínimas inibitórias (CMI) de >4 mg/L, >2mg/L, >2mg/L e ≥16mg/L, respetivamente (EUCAST 2014).

_Resultados

Desde julho de 2012 até dezembro de 2014 foram estudadas 185 estirpes de *C. difficile*: 31 estirpes provenientes de 3 hospitais da região Norte; 83 estirpes de 5 hospitais da região Centro; 63 estirpes de 8 hospitais da região de Lisboa e Vale do Tejo; uma estirpe de um hospital no Alentejo e 7 estirpes provenientes de 2 hospitais do Algarve.

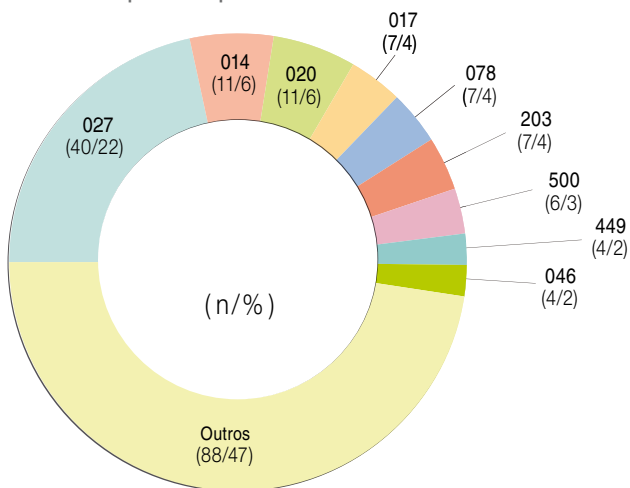
Observou-se uma grande variabilidade genética entre as 185 estirpes de *C. difficile* estudadas, com 64 ribotipos identificados. O ribotipo hipervirulento 027 foi o mais frequente, sendo responsável por 22,0% (40/185) do total de casos isolados, constituin-

artigos breves_ n. 5

do 34,9% (29/83) dos casos internados nos 5 hospitais da região Centro, 14,3% (9/63) dos casos provenientes dos 8 hospitais da região de Lisboa e Vale do Tejo e 25,0% (2/8) dos casos identificados nos 3 hospitais das regiões do Alentejo e Algarve. Este ribotipo não foi detetado em nenhum dos 3 hospitais da região Norte.

Para além do ribotipo 027, os ribotipos mais frequentes foram 020, 014 (6% cada) e os ribotipos 017, 078 e 203 (4% cada) (gráfico 1).

Gráfico 1: Distribuição das 185 estirpes de *Clostridium difficile* por ribotipo.



Do total das estirpes analisadas, 95,1% (176/185) eram toxigénicas, sendo 88,6% (164/185) positivas para ambas as toxinas A e B, 6,5% (12/185) positivas apenas para a toxina B (toxA-/toxB+) e 4,3% (8/185) negativas (gráfico 2). Acrescente-se que 58,3% (7/12) das estirpes com o fenótipo toxA-/toxB+ pertenciam ao ribotipo 017. Das 185 estirpes de *C. difficile*, 54 (29,2%) eram ainda positivas para a toxina binária (gráfico 2), das quais 70,4% (38/54) pertenciam ao ribotipo 027.

Em 31,4% (58/185) das estirpes estudadas foram identificados polimorfismos no gene *tcdC*, regulador negativo da produção das toxinas A e B. Apesar de a maioria (69%; 40/58) pertencer ao ribotipo 027, também foram detetadas mutações noutras ribotipos emergentes, tais como os ribotipos 176, 078, 438 e 126.

Em relação às resistências aos antimicrobianos, globalmente, detetou-se uma frequência de estirpes resistentes à moxifloxacina de 34,1% (63/185). Em relação ao imipenem a frequência de resistên-

cia foi de 64,9% (24/37), da qual 29,8% (11/37) corresponde a homoresistência e 35,1% (13/37) a heteroresistência (gráfico 3). Para a moxifloxacina foi observada uma CMI₅₀ de 2,0mg/L e CMI₉₀ > 32mg/L, enquanto que para o imipenem verificou-se uma CMI₅₀ > 32mg/L e CMI₉₀ > 32mg/L, incluindo heteroresistências.

A frequência de estirpes resistentes ao metronidazol e à vancomicina foi de 7,1% (13/183) e 1,7% (3/183) respetivamente (gráfico 3), sendo as CMI₅₀ de 0,38mg/L e CMI₉₀ de 1,5mg/L para o metronidazol e CMI₅₀ de 0,75mg/L e CMI₉₀ de 1mg/L para a vancomicina.

Gráfico 2: Distribuição das 185 estirpes de *Clostridium difficile* quanto à presença dos genes das toxinas A, B e toxina binária.

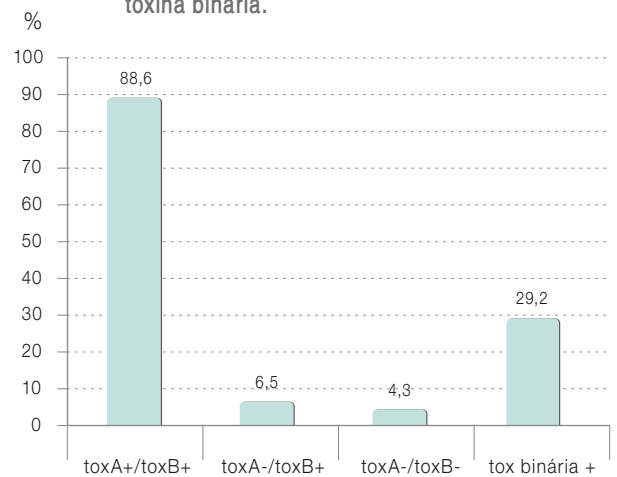
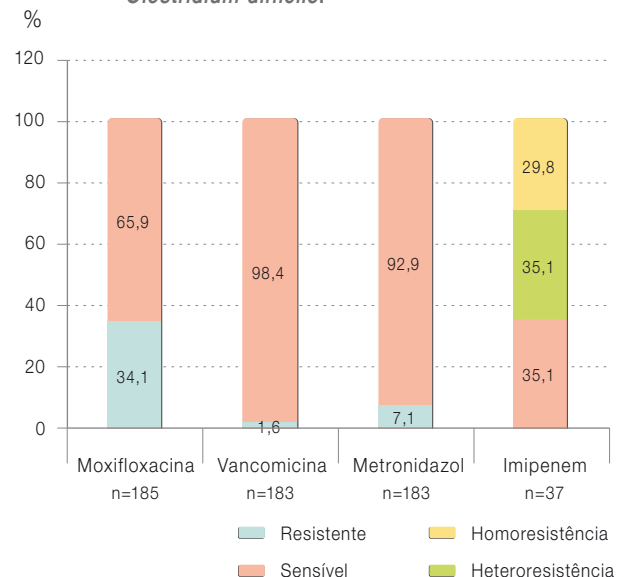


Gráfico 3: Suscetibilidade aos antimicrobianos das estirpes de *Clostridium difficile*.





artigos breves_ n. 5

Tabela 1: Comparação da suscetibilidade aos antimicrobianos entre o ribotipo 027 e os restantes ribotipos.

	Moxifloxacina			Vancomicina			Metronidazol		
	CMI ₅₀ *	CMI ₉₀ *	Intervalo CMI	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Intervalo CMI	CMI ₅₀ *	CMI ₉₀ *	Intervalo CMI
Ribotipo 027 (n=40)	>32	>32	>32	0,75	1	0,19-2,0	1,5	3	<0,016-16
Outros Ribotipos (n=145)	1,5	3	0,38->32	0,75	1,5	0,125-3,0	0,25	1	<0,016-6,0

CMI: concentração mínima inibitória

* Diferença significativa entre concentrações mínimas inibitórias ($P_{t-student} < 0,05$)

Comparando as resistências do ribotipo 027 com os outros ribotipos, aquele apresentou uma resistência mais elevada à moxifloxacina e uma suscetibilidade reduzida ao metronidazol, sendo a diferença para as CMI₅₀ e CMI₉₀ entre os dois grupos significativa ($P_{t-student} < 0,05$) (tabela 1). A suscetibilidade à vancomicina foi idêntica para o ribotipo 027 e restantes ribotipos (tabela 1).

O gene *ermB*, associado à resistência à clindamicina, foi identificado em 11,5% (21/182) do total de estirpes de *C. difficile* analisadas. Destas 21 estirpes, 5 (23,8%) apresentaram resistência simultânea à moxifloxacina e imipenem, sendo que 4 pertenciam ao ribotipo 017.

Discussão e conclusão

C. difficile é uma bactéria Gram positiva, formadora de esporos, anaeróbia estrita frequentemente implicada em casos de diarreia nosocomial. A infeção é causada por estirpes toxinogénicas, embora existam naturalmente estirpes não produtoras de toxinas, capazes de colonizar os seus hospedeiros.

Em Portugal, os dados epidemiológicos referentes a esta infeção são escassos, embora nos últimos anos tenha existido um esforço de várias entidades para que seja melhor conhecida a distribuição nacional da infeção por *C. difficile*. Este trabalho é um contributo para esse conhecimento, tendo em conta a amostra de conveniência dos hospitais envolvidos, assente naqueles que, durante períodos de tempo diferentes, voluntariamente aceitaram participar no estudo.

A grande variabilidade genética de estirpes de *C. difficile* encontrada numa mesma unidade hospitalar, fora de um contexto de surto, é comum, sugerindo quer infeção hospitalar quer comunitária. Em con-

trapartida, o predomínio de um único ribotipo numa mesma unidade hospitalar, sugere uma origem nosocomial da infeção por *C. difficile*, normalmente associada a estirpes mais resistentes e, conseqüentemente, com elevada capacidade de disseminação em meio hospitalar, como pode ser exemplo o ribotipo 027, identificado na região centro do país. De acordo com a literatura, a elevada prevalência de ribotipos mais virulentos e resistentes pode ter uma implicação direta na taxa de incidência da infeção por *C. difficile* (8).

Para além do ribotipo 027, outros genótipos têm emergido ultimamente na Europa, como é o caso dos ribotipos 017 e 078, também encontrados neste estudo. Relativamente ao ribotipo 017, apesar de apenas produzir a toxina B, tem sido recentemente associado a vários surtos, com uma amplitude mundial, bem como a doença severa e elevada letalidade, o que evidencia bem a virulência deste ribotipo (9,10). Acresce ainda a elevada resistência do ribotipo 017 a vários antibióticos em simultâneo, como as fluoroquinolonas, clindamicina e imipenem, antibióticos geralmente implicados na pressão seletiva e conseqüente disseminação de estirpes resistentes.

Embora a maioria dos isolados clínicos seja habitualmente sensível aos antibióticos utilizados no tratamento da infeção por *C. difficile*, tem-se vindo a registar um aumento de casos refratários à terapêutica com estes antibióticos, sobretudo ao metronidazol (11). Também já foram descritas estirpes de *C. difficile* com suscetibilidade diminuída ao metronidazol e à vancomicina, no entanto ainda não foi possível estabelecer uma correlação entre o fenótipo de resistência da estirpe e a falência terapêutica.

Em conclusão, a elevada frequência de ribotipos mais virulentos e emergentes detetada neste estudo, aliada à elevada taxa de re-



sistência aos antimicrobianos, pode antecipar uma rápida disseminação destas estirpes em ambiente hospitalar, evidenciando a necessidade de implementação de um sistema de vigilância ativo da infeção por *C. difficile* em Portugal.

Agradecimentos

Aos laboratórios de patologia clínica dos hospitais participantes: Centro Hospitalar de Coimbra, Centro Hospitalar de Vila Conde, Centro Hospitalar do Algarve, Centro Hospitalar do Oeste, Centro Hospitalar Lisboa Central, Hospitais da Universidade de Coimbra, Hospital Beatriz Ângelo, Hospital da Guarda, Hospital de Aveiro, Hospital de Braga, Hospital de Cascais, Hospital de Cova da Beira, Hospital de Santarém, Hospital de Viana do Castelo, Hospital de Vila Franca, Hospital do Baixo Alentejo, Hospital Garcia de Orta, Hospital Prof. Doutor Fernando Fonseca.

À doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. Clostridium difficile infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2009; 7(7):526-36.
- (2) Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for Clostridium difficile infection. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(Suppl 2):1-26.
- (3) He M, Miyajima F, Roberts P, et al. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated Clostridium difficile. *Nat Genet*. 2013;45(1):109-13. Epub 2012 Dec 9. [LINK](#)
- (4) Oleastro M, Coelho M, Gião M, et al. Outbreak of Clostridium difficile PCR ribotype 027-the recent experience of a regional hospital. *BMC Infect Dis*. 2014;14:209. [LINK](#)
- (5) Freeman J, Bauer MP, Baines SD, et al. The changing epidemiology of Clostridium difficile infections. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(3):529-49. [LINK](#)
- (6) Hunt JJ, Ballard JD. Variations in virulence and molecular biology among emerging strains of Clostridium difficile. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2013;77(4):567-81. [LINK](#)
- (7) Gerding DN, Johnson S, Rupnik M, et al. Clostridium difficile binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes*. 2014;5(1):15-27. Epub 2013 Oct 31. [LINK](#)
- (8) Davies KA, Longshaw CM, Davis GL, et al. Underdiagnosis of Clostridium difficile across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of Clostridium difficile infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID). *Lancet Infect Dis*. 2014;14(12):1208-19.
- (9) Arvand M, Hauri AM, Zaiss NH, et al. Clostridium difficile ribotypes 001, 017, and 027 are associated with lethal *C. difficile* infection in Hesse, Germany. *Euro Surveill*. 2009;14(45): pii: 19403. [LINK](#)
- (10) Collins DA, Hawkey PM, Riley TV. Epidemiology of Clostridium difficile infection in Asia. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2013;2(1):21. [LINK](#)
- (11) Pepin J, Alary ME, Valiquette L, et al. Increasing risk of relapse after treatment of Clostridium difficile colitis in Quebec, Canada. *Clin Infect Dis*. 2005;40(11):1591-7. [LINK](#)

Abordagem multidisciplinar na identificação e monitorização de cianobactérias potencialmente tóxicas

Catarina Churro, Elisabete Valério

catarina.churro@insa.min-saude.pt

Unidade de Água e Solo. Departamento de Saúde Ambiental, INSA.

Figura 1: ↓ Florescência das cianobactérias *Microcystis aeruginosa* e *Planktothrix agardhii* em uma albufeira portuguesa usada para fins recreativos.



Introdução

O que são cianobactérias?

Cianobactérias são organismos procariotas fotossintéticos, e como constituintes naturais do fitoplâncton são uma componente essencial na produção primária e cadeia alimentar em ambientes de água superficiais. Contudo são também responsáveis pela eutrofização dos recursos hídricos, uma vez que algumas espécies podem desenvolver-se rapidamente e formar grandes acumulações chamadas de florescências ou *blooms* (figura 1). Este desenvolvimento anómalo afeta adversamente a qualidade das águas superficiais que são usadas para captação de água para consumo humano, atividades recreativas e agricultura (1).

Porquê a monitorização de cianobactérias?

O risco que as florescências cianobacterianas representam para a saúde humana advêm do facto destes desenvolvimentos excessivos estarem frequentemente associados à produção de cianotoxinas (quadro 1) (1). As principais vias de exposição para o homem são através de água potável contaminada, diálise, consumo de

peixe e marisco contaminado e atividades recreativas (2). A toxicidade destes compostos é elevada, como pode ser constatado no gráfico 1 em que está representada a comparação da toxicidade, com base na dose-letal (LD50%) em murganhos, entre as cianotoxinas e algumas das toxinas mais conhecidas em relação ao cianeto (3).

Métodos

Identificação e quantificação tradicional de cianobactérias

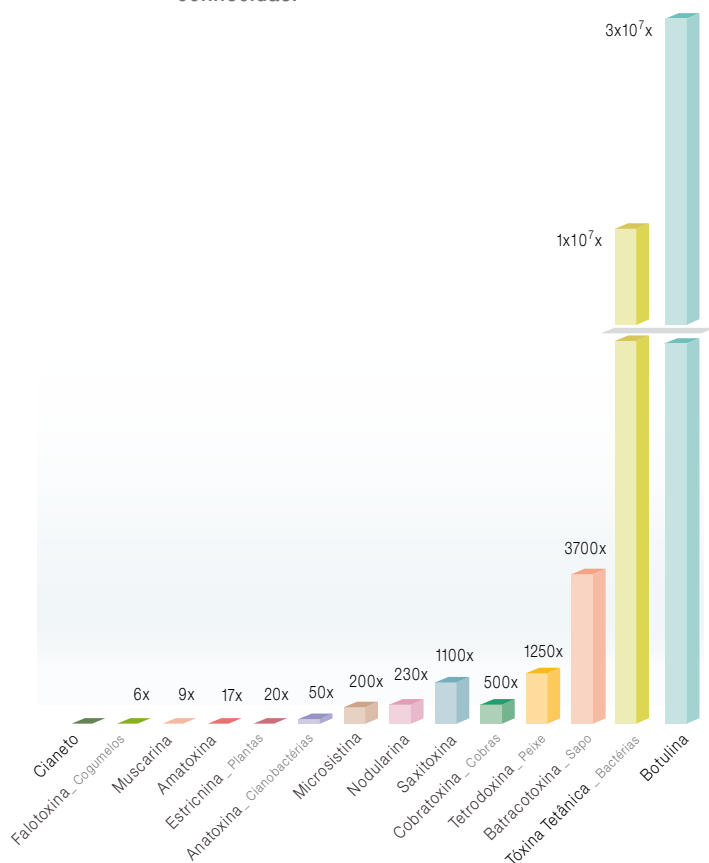
As cianobactérias são identificadas por taxonomia clássica usando microscopia ótica, com base em características morfológicas que são utilizadas para classificar as várias espécies. A quantificação celular é determinada pela contagem de células individuais em câmaras de sedimentação com volume conhecido usando o método de Utermöhl (4). Este processo é dependente do operador, sendo necessário uma pessoa com experiência e conhecimentos apro-

Quadro 1: ↓ Cianotoxinas produzidas por cianobactérias comuns nas albufeiras portuguesas.

Cianotoxina	Atividade	Cianobactéria
Hepatotoxinas		
Microcistinas	Inibição das fosfatases proteicas	<i>Microcystis, Anabaena, Nostoc, Planktothrix, Anabaenopsis, Phormidium</i>
Cilindrospermopsina	Inibição da síntese proteica	<i>Cylindrospermopsis, Aphanizomenon, Anabaena, Raphidiopsis</i>
Neurotoxinas		
Anatoxina-a	Liga-se aos recetores de acetilcolina nicotínicos	<i>Aphanizomenon, Anabaena, Raphidiopsis, Oscillatoria, Planktothrix, Cylindrospermum</i>
Anatoxina-a(s)	Inibe a acetilcolinesterase	<i>Aphanizomenon, Anabaena</i>
Saxitoxina	Liga-se aos canais de sódio	<i>Aphanizomenon, Anabaena, Planktothrix, Cylindrospermopsis, Lyngbya</i>

Adaptado de Codd 2014) (3) e Merel et al. 2013 (5).

Gráfico 1: Comparação da toxicidade relativamente ao cianeto, com base na dose letal (LD50%) em murganhos, entre as cianotoxinas e algumas das toxinas mais conhecidas.



Adaptado de Metcalf e Codd 2014 (3).

fundados de taxonomia para conseguir uma correta identificação. Contudo, para algumas cianobactérias a distinção entre espécies é uma tarefa difícil mesmo para um taxonomista experiente assim como é difícil de distinguir o limite entre células, o que pode interferir com a sua estimativa.

Deteção e quantificação de cianotoxinas

A deteção e quantificação de muitas cianotoxinas (microcistinas, cilindropermopsina, anatoxina e saxitoxina) podem ser feitas através de imunoensaios-ELISA ou ensaios de ligação ao recetor-RBA. Estes ensaios detetam e quantificam através do reconhecimento e ligação a anticorpos ou recetores específicos. Estes métodos são rápidos e sensíveis contudo pode haver reações inespecíficas levando a uma sobrestimação da quantidade de toxina presente (5). A cromatografia líquida de alta eficiência-HPLC permite o estudo

aprofundado das toxinas e suas variantes. No entanto requer um extenso processamento da amostra e padrões específicos para cada toxina (3,5).

Classificação e identificação molecular de cianobactérias

A obtenção de sequências de ADN de genes envolvidos em diferentes processos celulares, como é o caso dos genes *house-keeping* rRNA 16S, *rpoC1* e *cpcB* providenciam a classificação e identificação molecular das espécies cianobacterianas. A similaridade das sequências destes genes com outras sequências presentes nas bases de dados dá uma indicação da identidade do organismo. A análise filogenética estabelece relações de proximidade e ancestralidade com base na similaridade das sequências de ADN. Recorrendo a uma análise filogenética *multilocus* destes marcadores, aumenta a resolução da identificação dos isolados de cianobactérias até à espécie. Contudo a classificação molecular requer monoculturas ou culturas puras de cianobactérias.

Deteção de genes associados à produção de toxinas

As cianotoxinas só são produzidas pelas estirpes que contêm os genes apropriados para o fazer. Já foram descobertos e sequenciados quase todos os *clusters* de genes que conferem às cianobactérias a capacidade de proceder à síntese da maior parte das cianotoxinas. A sequenciação completa destes *clusters* permitiu o desenvolvimento de sondas moleculares gerais para estirpes tóxicas das diversas toxinas e específicas para algumas espécies produtoras (6). A amplificação destes marcadores indica o potencial de produção de determinada toxina em amostras ambientais.

Quantificação por PCR em tempo-real

A quantificação do número de cópias de um determinado gene em amostras naturais é possível recorrendo à técnica de PCR em tempo-real. Várias sondas foram já desenvolvidas para a quantificação da população total de uma determinada cianobactéria usando o gene rRNA 16S, *cpcB* e *rpoC1* (6,7). Estão também disponíveis várias sondas para os genes envolvidos na produção das várias toxinas o que permite quantificar diversos génotipos e a sua proporção numa determinada amostra.

Expressão génica

A taxa de produção das cianotoxinas é também influenciada por fatores ambientais, tais como pH, nutrientes, temperatura e intensidade luminosa (8-10). Têm-se realizado vários estudos no sentido de compreender de que forma estes fatores ambientais afetam/alteram a expressão dos genes das cianobactérias, principalmente os genes dos *clusters* responsáveis pela produção de cianotoxinas.

Manutenção de culturas de cianobactérias

O isolamento e manutenção de culturas monoclonais de cianobactérias provenientes de florescências dão um apoio fundamental ao estudo e monitorização destes organismos. A existência dessas culturas permite avaliar a sua toxicidade, traçar o perfil de toxinas que produzem, obter o ADN para testar e desenvolver sondas moleculares e efetuar o estudo aprofundado da sua identificação.

_Conclusões

Desafios na monitorização de cianobactérias e multidisciplinaridade

As florescências cianobacterianas são fenómenos complexos e os fatores que regulam o seu aparecimento, desenvolvimento e persistência nos sistemas aquáticos ainda não são completamente conhecidos. Compostas frequentemente por diferentes espécies produtoras e não produtoras de toxinas, acresce que dentro da mesma espécie existem estirpes tóxicas e não tóxicas. Além do mais, a regulação genética e fatores que influenciam a produção de cianotoxinas são ainda um desafio para os investigadores. Várias toxinas podem estar presentes e podem ter origem no mesmo ou em diferentes organismos. Neste contexto, é importante compreender que organismos estão presentes, averiguar se têm o potencial para produzir toxinas, que toxinas podem produzir e se estão ativamente em produção.

Todos os métodos anteriormente descritos dão uma informação diferente e pertinente para o estudo da composição das florescências cianobacterianas (figura 2).

A identificação e enumeração ao microscópio podem ser demoradas e trabalhosas mas fornece informação detalhada sobre a composição de espécies. A deteção imunológica de toxinas é um método rápido e sensível para a quantificação de toxinas na água potável antes e depois do tratamento. O imunoensaio em conjunto com a identificação e quantificação microscópica dá informação útil sobre a composição e abundância da comunidade e quantidade de toxina para as análises de rotina de amostras ambientais.

A deteção molecular de genes responsáveis pela produção de cianotoxinas informa se os organismos presentes na amostra têm ou não o potencial para a sua produção, o que se torna muito útil como ferramenta de rastreio para as várias toxinas que possam estar presentes e direcionando qual o imunoensaio que deverá ser aplicado para a deteção de uma toxina específica.

Figura 2: ↓ Multidisciplinaridade na identificação e monitorização de cianobactérias potencialmente tóxicas.





artigos breves_ n. 6

O PCR em tempo-real faculta a quantificação precisa de um determinado gene, permitindo assim obter informação sobre composição de genótipos tóxicos que aliado ao imunoensaio indica estirpes tóxicas e não tóxicas e se estão em produção ativa de toxina. Esta abordagem é também bastante útil na quantificação de espécies difíceis de identificar e contar por microscopia ótica.

Outros métodos que têm limitações para ser aplicados em rotina podem fornecer informações importantes para complementar e facilitar a monitorização. A análise aprofundada do perfil toxicológico dos isolados por HPLC, ou a identificação das espécies por análise filogenética permite saber que toxinas e que espécies podemos observar nas amostras de campo. O estudo da regulação genética da produção de cianotoxinas por PCR em tempo-real permite compreender em que condições os organismos produzem toxina, e que fatores influenciam a sua produção.

De forma a dar respostas na prevenção da exposição a cianotoxinas em saúde pública, o estudo e monitorização de cianobactérias e cianotoxinas deve recorrer às várias metodologias de uma forma multidisciplinar, em que cada uma delas se complementa e contribui com uma pequena peça do grande *puzzle* que são as florescências cianobacterianas.

Referências bibliográficas:

- (1) Chorus I, Bartram J (eds). Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. London; New York: E&FN Spon, behalf of UNESCO, WHO, UNEP, 1999. [LINK](#)
- (2) Codd G, Bell S, Kaya K, et al. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. Eur. J. Phycol. 1999;34(4):405-15.
- (3) Metcalf J, Codd G. Cyanobacterial toxins (cyanotoxins) in water: A review of current knowledge. United Kingdom: Foundation for Water Research, 2014. [LINK](#)
- (4) BS EN 15204:2006 - Water quality. Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique). London: British Standards Institution, 2006.
- (5) Merel S, Walker D, Chicana R, et al. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. Environ Int. 2013;59:303-27.
- (6) Kurmayer R, Christiansen G. The genetic basis of toxin production in Cyanobacteria. Freshw Rev. 2009; 2:31-50. [LINK](#)
- (7) Churro C, Pereira P, Vasconcelos V, et al. Species-specific real-time PCR cell number quantification of the bloom-forming cyanobacterium *Planktothrix agardhii*. Arch Microbiol. 2012;194(9):749-57.
- (8) Sivonen, K. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. Appl Environ Microbiol. 1990;56(9):2658-66. [LINK](#)
- (9) Song L, Sano T, Li R, et al. Microcystin production of *Microcystis viridis* (cyanobacteria) under different culture conditions. Phycol. Res. 1998;46(Suppl 2): 19-23.
- (10) Wiedner C, Visser PM, Fastner J, et al. Effects of light on the Microcystin content of *Microcystis* strain PCC 7806. Appl Environ Microbiol. 2003;69(3):1475-81. [LINK](#)

Avaliação do efeito da microcistina-LR no crescimento, sistema antioxidante e indução de apoptose em *Saccharomyces cerevisiae*

Elisabete Valério^{1,2}, Arminda Vilares¹, Alexandre Campos², Paulo Pereira¹, Vítor Vasconcelos^{2,3}

elisabete.valerio@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Água e Solo. Departamento de Saúde Ambiental, INSA.

(2) Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, Universidade do Porto.

(3) Departamento de Biologia. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto.

Introdução

Algumas das toxinas mais comuns presentes na água doce são produzidas por cianobactérias, em particular as microcistinas (MC). Estas toxinas são conhecidas por causar hepatotoxicidade aguda em humanos e animais e por atuarem como promotores tumorais sendo reconhecidas pela International Agency for Research on Cancer (IARC), como agentes potencialmente carcinogénicos para o ser humano (1). Em células de mamíferos, o mecanismo de toxicidade das microcistinas é atribuída a um processo que envolve várias vias, um deles relacionado com a inibição das fosfatases proteicas PP1 / PP2A e a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) (2). Porém, a informação toxicológica e epidemiológica disponível não permite ainda estabelecer inequivocamente uma relação causa-efeito entre a exposição humana às MC e efeitos adversos na saúde.

Neste trabalho pretendeu-se usar a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo para compreender melhor os mecanismos de toxicidade induzidos pela microcistina-LR. Este é o organismo eucariótico mais simples e estudado que tem sido amplamente utilizado como modelo no estudo de mecanismos de toxicidade, devido à facilidade de acesso à informação sobre o seu genoma (totalmente sequenciado e anotado), proteoma e processos bioquímicos correspondentes. Acresce que cerca de 31% das proteínas codificadas no genoma da levedura têm um ortólogo humano e aproximadamente 50% dos genes de doenças humanas têm um ortólogo na levedura. Existe ainda uma elevada conservação das estruturas celulares e enzimáticas e resposta ao stress oxidativo

como nos eucariotas superiores (3).

Objetivos

Neste estudo pretendeu-se avaliar os efeitos de várias concentrações de microcistina-LR (MCLR) no crescimento, níveis de ROS, resposta do sistema antioxidante e indução de apoptose na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Metodologia

Na figura 1 está representada a abordagem metodológica empregue para avaliar os efeitos da MCLR nas células da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* VL3 (Zymaflore).

Figura 1: Abordagem metodológica empregue para avaliar os efeitos da MCLR nas células da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* VL3 (Zymaflore).

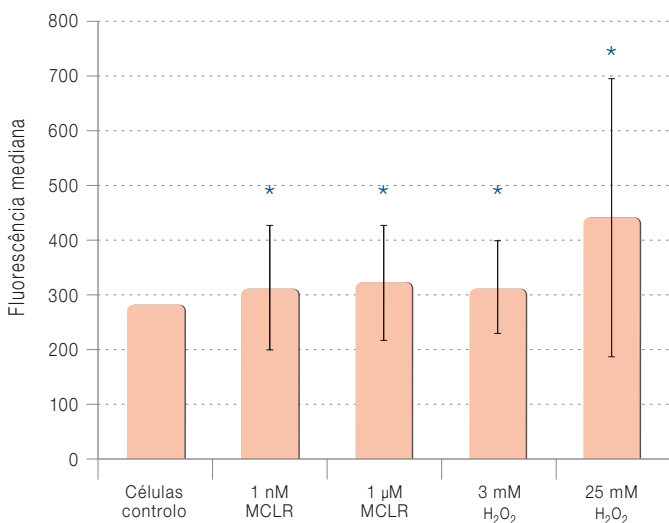


Resultados e discussão

Verificou-se que o crescimento microbiano não foi inibido na presença das várias concentrações de toxina testadas (1 nM, 10 nM, 1 µM, 10 µM e 100 µM), relativamente ao controlo.

Contudo, após coloração das células com fluorocromos, verificou-se que a exposição das células à toxina induziu um aumento dos níveis intracelulares dos ROS totais, como se pode verificar no gráfico 1. A presença de 1 nM de MCLR provocou um aumento de 11% enquanto a concentração de 1 µM de MCLR levou a um aumento de 14% dos níveis de fluorescência. A presença de H₂O₂ foi usada como controlo positivo, em que a concentração de 3 mM causou um aumento de 11% vs. 57% de aumento induzido pela presença de 25 mM de H₂O₂.

Gráfico 1: Fluorescência mediana (± desvio padrão) das células coradas com Dihidrorodamina 123 (DHR123) para avaliar os níveis intracelulares globais de ROS (n=200).



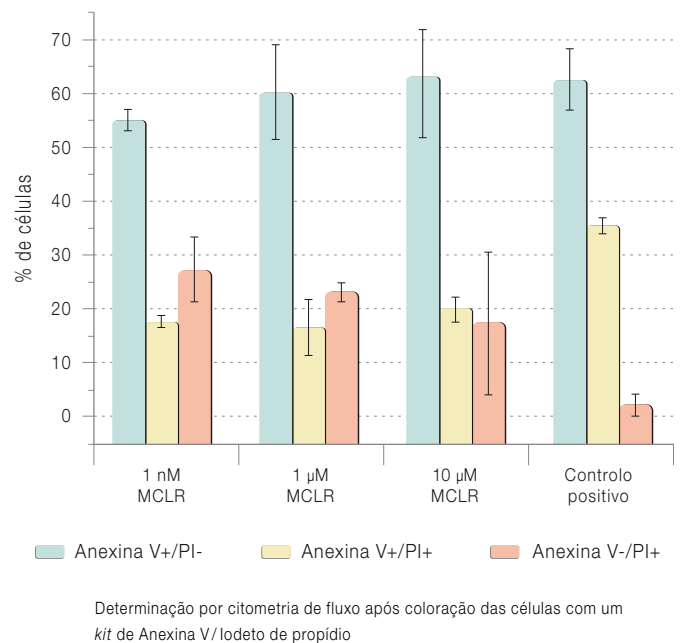
* Diferenças significativas entre as células tratadas e as células controlo (p < 0,05).

Este aumento provocou uma ativação do sistema antioxidante, especialmente na resposta da catalase, em que se observou o dobro da atividade relativa com 1 nM de MCLR e um aumento de 60% com 1 µM de MCLR. Além disso, observou-se uma inibição da SOD1, com uma diminuição de 40% com 1 nM de MCLR e menos 20% com 1 µM MCLR. Este resultado, em conjunto com os tipos de ROS possivelmente presentes, sugere que a espécie reativa de oxigénio maioritariamente induzida seja o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) (4).

Podemos supor que o aumento da atividade relativa da catalase foi a forma das células superarem o aumento dos níveis de ROS, levando à eliminação dos mesmos, o que pode explicar a ausência de impacto da presença da toxina no crescimento da levedura.

Observaram-se ainda sinais de apoptose após coloração das células *in vivo* com DAPI e também após avaliação das células coradas com um kit de Anexina V-FITC / iodeto de propídeo por citometria de fluxo (gráfico 2).

Gráfico 2: Percentagem de células (média ± σ) em início de apoptose (azul), apoptose tardia (amarelo) e necrose (laranja) após exposição a MCLR (n = 3).



Determinação por citometria de fluxo após coloração das células com um kit de Anexina V / iodeto de propídeo

Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* VL3 apresenta alguns dos principais efeitos tóxicos induzidos pela microcistina-LR em eucariotas superiores. Esta levedura, comprovou assim ser um simples e bom modelo eucariótico para futuramente estudar em mais detalhe os mecanismos moleculares de toxicidade induzidos pela microcistina-LR.



Agradecimentos

Os autores agradecem ao prof. Rui Malhó pelo apoio nos ensaios de fluorescência. Este trabalho foi parcialmente financiado pelo Programa Operacional Potencial Humano, pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia através da Bolsa de pós-doc SFRH/BPD/75922/2011 e o Projeto PEst-C/MAR/LA0015/2013.

Artigo adaptado de: Valério E, Vilares A, Campos A, et al. Effects of microcystin-LR on *Saccharomyces cerevisiae* growth, oxidative stress and apoptosis. *Toxicol.* 2014;90:191-8.

Referências bibliográficas:

- (1) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Ingested nitrate and nitrite and cyanobacterial peptide toxins. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2006. p. 326-412. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; 94). [LINK](#)
- (2) Campos A, Vasconcelos V. Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. *Int J Mol Sci.* 2010;11(1):268-87. [LINK](#)
- (3) Menacho-Márquez M, Murguía JR. Yeast on drugs: *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for anticancer drug research. *Clin Transl Oncol.* 2007;9(4):221-8.
- (4) Bowler C, Van Camp W, Van Montagu M, et al. Superoxide dismutase in plants. *Crit Rev Plant Sci.* 1994;13(3):199-218



Prevalência ao nascimento dos défices da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos na Península Ibérica

Hugo Rocha¹, Daisy Castiñeiras², Carmen Delgado³, José Egea⁴, Raquel Yahyaoui⁵, Yolanda González⁶, Manuel Conde³, Inmaculada González⁴, Inmaculada Rueda⁵, Luis Rello⁶, Laura Vilarinho¹, José Cocho²

hugo.rocha@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética. Departamento de Genética Humana, INSA.

(2) Laboratorio de Metabolopatías. Hospital Clínico Universitario de Santiago. Universidad de Santiago, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.

(3) Unidad de Metabolopatías, Hospital Universitario Virgen del Rocío.

(4) Laboratorio de Metabolopatías. Centro de Bioquímica y Genética Clínica, Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca.

(5) Laboratorio de Metabolopatías, Carlos Haya University Hospital (Málaga).

(6) Unidad de Metabolopatías. Servicio de Bioquímica Clínica, Hospital Universitario Miguel Servet (Zaragoza).

Introdução

A β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos é uma via metabólica chave na produção de energia, nomeadamente em situações de jejum e de stress metabólico (1, 2). Para que todo o processo decorra de uma forma eficaz, mais de 25 proteínas têm de desempenhar a sua função de uma forma coordenada, sendo que deficiências em cerca de quinze delas estão associadas a doenças humanas (2, 3). Os défices da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos são um grupo de doenças metabólicas, com um modo de transmissão autossómico recessivo, que podem apresentar fenótipos clínicos bastante heterogéneos que afetam fundamentalmente o coração, o fígado e o músculo esquelético (3). Alguns doentes podem ter uma apresentação multissistémica grave, que pode incluir a morte no período neonatal, enquanto outros podem apresentar crises de hipoglicemia hipocetótica durante períodos de doença (febre), episódios de rabdomiólise provocados por exercício físico vigoroso, ou ainda manter-se assintomáticos (4). Supõem-se que a fisiopatologia se deva fundamentalmente à deficiente produção de energia, à acumulação de intermediários metabólicos tóxicos ou de proteínas mutadas, e em alguns casos à depleção de carnitina. O aparecimento dos sintomas é em muitas situações despoletado por situações de stress, como o jejum ou infeções (5). O tratamento assenta

fundamentalmente em evitar o jejum prolongado, e em alguns casos na suplementação com carnitina, riboflavina ou coenzima Q10 (6) e geralmente conduz a uma diminuição da mortalidade e morbilidade associadas a este grupo de patologias, nomeadamente quando este se inicia num período pré-sintomático (7). A existência de um tratamento eficaz, associado à existência de um método de deteção pré-sintomática, faz deste grupo de doenças um objetivo primordial dos Programas de Rastreio Neonatal.

Os Programas de Rastreio Neonatal, para além de programas de saúde pública, que visam evitar a progressão da doença nas crianças, através da institucionalização precoce de tratamento, são igualmente fontes privilegiadas de dados epidemiológicos sobre as doenças rastreadas. Com base em dados de programas de rastreio neonatal, estima-se que este grupo de patologias tenha uma prevalência ao nascimento de aproximadamente 1:9.000 recém-nascidos, embora estejam reportadas diferenças significativas entre vários grupos populacionais (tabela 1). Com o intuito de estimar a prevalência ao nascimento dos diferentes défices da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos na Península Ibérica e compara-los com o publicado para outras populações, foram neste trabalho recolhidos dados de vários Programas de Rastreio Neonatal Ibéricos. Um melhor conhecimento dos dados epidemiológicos das doenças rastreadas possibilita não só um melhor conhecimento da sua história natural, mas também definir estratégias mais eficazes em termos de saúde pública.

Objetivo

Determinar a prevalência ao nascimento dos défices da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos na Península Ibérica.

Materiais e métodos

O presente estudo inclui dados do rastreio metabólico por espectrometria de massa em tandem de 1.672.286 recém-nascidos da Península Ibérica (812.902 portugueses e 859.384 espanhóis) (tabela 1). Os dados são de seis programas de Rastreio Neonatal, o programa português e de cinco programas espanhóis (Galiza, Múrcia, Andaluzia oriental, Andaluzia ocidental e Aragão/La Rioja). Os programas participantes são todos programas de saúde pública bem implementados e que rastreiam todos os recém-nascidos das suas

Tabela 1: Número de défices da β -oxidação dos ácidos gordos detetados nos Programas de Rastreio Neonatal participantes e respetivas prevalências ao nascimento estimadas, assim como os dados disponíveis na bibliografia para outras populações.

Região	Recém-nascidos rastreados	Défices da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos																
		SCADD		MCADD		VLCADD		LCHADD		MADD		CPT1		CPT2		CUD		Total
Península Ibérica																		
Portugal	812.902	not screened		97	1/8.380	8	1/101.613	7	1/116.129	3	1/270.967	2	1/406.451	3	1/270.967	8	1/101.613	1/6.351
Galiza	278.371	5	1/55.674	14	1/19.884	0	0	3	1/92.790	0	0	0	0	0	0	0	0	1/12.653
Múrcia	124.942	1	1/124.942	3	1/41.647	0	0	2	1/62.471	1	1/124.942	0	0	0	0	1	1/124.942	1/15.618
Andaluzia ocidental	272.462	3	1/90.981	15	1/18.196	0	0	0	0	1	1/272.462	1	1/272.462	0	0	1	1/272.462	1/12.997
Aragão/La Rioja	54.901	1	1/54.901	3	1/18.300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/13.725
Andaluzia oriental	128.228	3	1/42.743	8	1/16.029	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1/42.743	2	1/60.114	1/8.014
Total	1.672.286	13	1/66.106	140	1/11.945	8	1/209.036	12	1/139.357	5	1/334.457	3	1/557.429	6	1/278.714	11	1/139.357	1/7.914
		IC 95% (1/113.111 - 1/38.634)		IC 95% (1/14.093 - 1/10.122)		IC 95% (1/415.522 - 1/105.923)		IC 95% (1/243.603 - 1/79.720)		IC 95% (1/783.014 - 1/142.860)		IC 95% (1/1.639.060 - 1/189.576)		IC 95% (1/608.135 - 1/127.737)		IC 95% (1/272.250 - 1/84.891)		IC 95% (1/9.054 - 1/6.916)
Áustria (9)	622.489	1/155.622		1/24.900		1/88.927		1/69.165		1/311.245		0		0		1/311.245		1/12.704
Alemanha (10)	583.555 ^a /1.084.195 ^b	1/64.839 ^a		1/14.080 ^b		1/180.699 ^b		1/216.839 ^b		1/194.517 ^a		1/1.084.195 ^b		1/1.084.195 ^b		1/194.518 ^a		1/9.198
Dinamarca (11)	190.287 ^a /504.049 ^b /363.538	1/190.287 ^a		1/9.164 ^b		1/168.016 ^b		1/168.016 ^b		0		1/363.538		0		1/100.810 ^b		1/7.691
Itália ^a	640.707	1/27.857		1/22.882		1/45.765		1/640.707		0		1/640.707		1/640.707		1/128.141		1/8.777
Grécia (12)	45.000	0		1/45.000		0		0		0		0		0		0		1/45.000
Suíça (13)	57.000			1/11.500														
Reino Unido (14)	1.500.000			1/10.204														
Bélgica (15)	120.000			1/15.000														
Holanda (16)	182.850			1/9.624														
EUA																		
Nova Inglaterra (17)	164.000	1/32.800		1/16.400		1/164.000		0		0		0		1/164.000		0		1/9.647
Carolina do norte (18)	944.078	1/118.010		1/12.933		1/78.673		1/314.693		0		0		1/472.039		0		1/9.633
Califórnia (19)	353.894	1/19.661		1/27.223		1/353.894		1/353.894		1/176.947		0		0		0		1/10.111
Michigan ^b	708.257	1/16.097		1/13.620		1/88.532		1/708.257		1/354.129		0		1/708.257		1/354.129		1/6.439
Japão (15)	102.000			1/51.000														
Arábia Saudita (20)	237.812			1/18.293														
Austrália (21)	362.000	1/72.400		1/21.294		1/120.667		0		0		0		0		1/120.667		1/12.929

^a Os dados de Itália foram extraídos dos relatórios nacionais de rastreio neonatal de 2006 a 2012 (http://www.simmesn.it/documents/rt_screening/index.html; consult. dez. 2013); ^b Os dados do estado do Michigan foram extraídos dos relatórios do Programa de 2006 a 2011 (http://www.michigan.gov/mistudentaid/0,4612,7-128-2942_1950-233593--,00.html; consult. set. 2013).

VLCADD – Défice da desidrogenase dos ácidos gordos de cadeia muito longa; LCHADD – Défice da desidrogenase dos ácidos gordos 3-hidroxilados de cadeia longa; MADD – Défice múltiplo das desidrogenases; MCADD – Défice da desidrogenase dos ácidos gordos de cadeia média; SCADD – Défice da desidrogenase dos ácidos gordos de cadeia curta; CPT1 – Deficiência em carnitina palmitoiltransferase 1; CPT2 – Deficiência em carnitina palmitoiltransferase 2; CUD – Défice primário em carnitina.



artigos breves_ n. 8

regiões. No seu conjunto, os programas participantes rastreiam 46.2% de todos os recém-nascidos anuais da Península Ibérica. A deteção de recém-nascidos afetados com défices da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos é efetuada em todos os programas de acordo com as melhores práticas internacionais, através da análise de perfis de acilcarnitinas em cartão de Guthrie. A confirmação de todos os casos identificados foi efetuada através de estudos moleculares e/ou enzimáticos.

_Resultados e discussão

Analisando as prevalências ao nascimento verificadas (tabela 1), torna-se claro que a prevalência conjunta dos diferentes défices da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos, é em Portugal (1/6.351) o dobro da observada em Espanha (1/12.104). Se efetuarmos a comparação excluindo a deficiência na desidrogenase dos ácidos gordos de cadeia curta (SCADD), não rastreada em Portugal, a diferença é ainda superior (1/6.351 *versus* 1/14.817). Sem dúvida que a deficiência na desidrogenase dos ácidos gordos de cadeia média (MCADD) é quem mais contribui para esta diferença, com uma prevalência ao nascimento de 1/8.380 (IC 95%; 1/10.221 a 1/6.869), a mais elevada de entre as populações com dados publicados. Esta elevada prevalência da MCADD em Portugal pode ser justificada pelo facto da grande maioria dos doentes (>90%) ser de origem cigana, uma comunidade caracterizada por elevados níveis de consanguinidade. O mesmo é observado em Espanha, mas não na mesma proporção. Esta é uma diferença epidemiológica significativa entre os doentes com MCADD da Península Ibérica em comparação com os outros países Europeus, onde os doentes na sua maioria não são de etnia cigana (8).

No seu conjunto, a Península Ibérica apresenta uma prevalência ao nascimento dos défices da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos de 1/7.914, uma das mais elevadas da Europa, apenas comparável à da Dinamarca e aos dados reportados para o estado do Michigan nos EUA.

_Conclusão

Em conclusão, Portugal apresenta a maior prevalência ao nascimento para défices da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos reportada até à data. A Península Ibérica no seu todo apresenta uma prevalência alinhada com o que se encontra reportado para outras populações caucasianas, mas exibindo dos valores mais altos publicados.

Considerando as vantagens decorrentes do rastreio, e do consequente início de uma terapia precoce num período pré-sintomático, dos défices da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos, os presentes resultados evidenciam a vantagem de rastrear todos os recém-nascidos da Península Ibérica para este grupo de doenças.

Artigo adaptado de: Rocha H, Castiñeiras D, Delgado C, et al. Birth Prevalence of Fatty Acid β -Oxidation Disorders in Iberia. *JIMD Rep.* 2014;16:89-94. [LINK](#)

Referências bibliográficas:

- (1) Bartlett K, Eaton S. Mitochondrial beta-oxidation. *Eur J Biochem.* 2004;271(3):462-9.
- (2) Houten SM, Wanders RJ. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33(5):469-77. [LINK](#)
- (3) Kompore M, Rizzo WB. Mitochondrial fatty-acid oxidation disorders. *Semin Pediatr Neurol.* 2008;15(3):140-9.
- (4) Wilcken B. Fatty acid oxidation disorders: outcome and long-term prognosis. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33(5):501-6.
- (5) Olpin SE. Pathophysiology of fatty acid oxidation disorders and resultant phenotypic variability. *J Inherit Metab Dis.* 2013;36(4):645-58.
- (6) Spiekerkoetter U, Bastin J, Gillingham M, et al. Current issues regarding treatment of mitochondrial fatty acid oxidation disorders. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33(5):555-61.
- (7) Baruteau J, Sachs P, Broué P, et al. Clinical and biological features at diagnosis in mitochondrial fatty acid beta-oxidation defects: a French pediatric study of 187 patients. *J Inherit Metab Dis.* 2013;36(5):795-803.
- (8) Khalid JM, Oerton J, Cortina-Borja M, et al.; UK Collaborative Study of Newborn Screening for MCADD. Ethnicity of children with homozygous c.985A>G medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: findings from screening approximately 1.1 million newborn infants. *J Med Screen.* 2008;15(3):112-7.
- (9) Kasper DC, Ratschmann R, Metz TF, et al. The national Austrian newborn screening program - eight years experience with mass spectrometry. past, present, and future goals. *Wien Klin Wochenschr.* 2010;122(21-22):607-13.
- (10) Lindner M, Gramer G, Haegel G, et al. Efficacy and outcome of expanded newborn screening for metabolic diseases-report of 10 years from South-West Germany. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6(1):44. [LINK](#)
- (11) Lund AM, Hougaard DM, Simonsen H, et al. Biochemical screening of 504,049 newborns in Denmark, the Faroe Islands and Greenland-experience and development of a routine program for expanded newborn screening. *Mol Genet Metab.* 2012;107(3):281-93.
- (12) Loukas YL, Soumelas GS, Dotsikas Y, et al. Expanded newborn screening in Greece: 30 months of experience. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33(Suppl 3):S341-8.



artigos breves_ n. 8

- (13) Rhead WJ. Newborn screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: a global perspective. *J Inherit Metab Dis.* 2006;29(2-3):370-7.
- (14) Oerton J, Khalid JM, Besley G, et al. Newborn screening for medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in England: prevalence, predictive value and test validity based on 1.5 million screened babies. *J Med Screen.* 2011;18(4):173-81.
- (15) Bodamer O, Pollitt RJ. Newborn screening and MCAD. Workshop results 37th European metabolic group meeting, Prague, Milupa, Friedrichsdorf, 2005.
- (16) Derks TG, Boer TS, van Assen A, et al. Neonatal screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency in The Netherlands: the importance of enzyme analysis to ascertain true MCAD deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 2008;31(1):88-96.
- (17) Zytkevich TH, Fitzgerald EF, Marsden D, et al. Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two-year summary from the New England Newborn Screening Program. *Clin Chem.* 2001;47(11):1945-55. [LINK](#)
- (18) Frazier DM, Millington DS, McCandless SE, et al. The tandem mass spectrometry newborn screening experience in North Carolina: 1997-2005. *J Inherit Metab Dis.* 2006;29(1):76-85.
- (19) Feuchtbaum L, Lorey F, Faulkner L, et al. California's experience implementing a pilot newborn supplemental screening program using tandem mass spectrometry. *Pediatrics.* 2006;117(5 Pt 2):S261-9. [LINK](#)
- (20) Al-Hassnan ZN, Imtiaz F, Al-Amoudi M, et al. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Saudi Arabia: incidence, genotype, and preventive implications. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33(Suppl 3):S263-7.
- (21) Wilcken B, Wiley V, Hammond J, et al. Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *N Engl J Med.* 2003;348(23):2304-12. [LINK](#)



Ciclamato em adoçantes de mesa: risco de ultrapassar a dose diária admissível

Bruno Ruela Sargaço¹, Maria Celeste C. Serra¹,
Elsa Reis Vasco²

elsa.vasco@insa.min-saude.pt

(1) Área Departamental de Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa.

(2) Departamento de Alimentação e Nutrição, INSA.

Introdução

Apesar de considerados como ingredientes modernos pelo consumidor, os edulcorantes intensos são utilizados há mais de um século. Com poder adoçante superior ao da sacarose, os edulcorantes podem ser adicionados em concentrações muito baixas, permitindo uma significativa redução nos custos de produção e uma contribuição calórica reduzida para o produto alimentar final ⁽¹⁾.

O ciclamato de sódio é um dos edulcorantes intensos mais consumidos na União Europeia e está aprovado para uso geral desde 1994 através da Diretiva 94/35/CE ⁽²⁾.

De todos os géneros alimentícios aprovados para o uso de ciclamato, os adoçantes de mesa são os únicos produtos para os quais não está estabelecido Limite Máximo de Utilização (LMU) nem obrigatoriedade de inclusão do teor em ciclamato no respetivo rótulo ⁽²⁾. Isto confere uma grande “liberdade” aos produtores alimentares que podem utilizar as quantidades consideradas necessárias e vantajosas à formulação dos adoçantes de mesa.

Independentemente do produto alimentar onde é utilizado, o ciclamato apresenta uma Dose Diária Admissível (DDA) de 7 mg/kg de peso corporal/dia que, ao ser ultrapassada, pode representar um risco para a saúde humana ⁽³⁾.

Deste modo, a monitorização do teor de ciclamato em adoçantes de mesa por métodos analíticos robustos é de elevada importância para avaliar a exposição alimentar e verificar qual o verdadeiro impacto do consumo destes produtos na saúde humana.

Objetivos

O presente trabalho teve por objetivos a determinação do teor de ciclamato em diferentes adoçantes de mesa e a consequente avaliação do risco de ultrapassar a DDA pelo consumo destes produtos.

Materiais e métodos

Vinte e oito amostras de adoçantes de mesa de quatro marcas diferentes, uma de granulado, uma de comprimidos e duas de líquido, foram adquiridas na região de Lisboa em 2012.

Com base na norma EN 12857 procedeu-se à otimização e validação de um método analítico de HPLC-UV para a determinação do ciclamato ⁽⁴⁾.

As análises foram efetuadas num sistema Waters A2690 HPLC equipado com um detetor de fotodiodos 2996 e uma coluna Li-Chrospher 60 RP-select B. Como fase móvel foi utilizada uma mistura de metanol e água (80:20), em modo isocrático a um fluxo de 1,0 ml/min. A deteção foi realizada a 314 nm e os resultados foram recolhidos e analisados com o software Empower 2. A quantificação do ciclamato nas amostras foi realizada pelo método do padrão externo e a concentração expressa em mg/kg e mg/L para amostras sólidas e líquidas, respetivamente.

Resultados e discussão

A **tabela 1** apresenta os resultados obtidos para os teores de ciclamato nos quatro tipos de adoçantes de mesa, assim como as respetivas taxas de recuperação e valores rotulados.

Tal como era esperado devido à inexistência de LMU para este tipo de produtos, os teores de ciclamato variaram significativamente nas diferentes marcas, apresentando valores entre 2,9 e 73,9%.

Pelo facto dos adoçantes de mesa serem usados como substitutos do açúcar, os edulcorantes intensos estão normalmente presentes em concentrações muito elevadas. Esta realidade é especialmente verificada para o ciclamato porque, tendo menor poder adoçante, pode estar presente em quantidades ainda maiores.

Tabela 1: Teor em ciclamato de sódio, respetiva taxa de recuperação e valores rotulados nos diferentes adoçantes de mesa.

Adoçante de mesa	Concentração ciclamato de sódio		Taxa de recuperação	Teor rotulado
	g/kg	%		
Unidades			%	%
Granulado	77 - 80	7,7 - 8,0	93 - 102	8
Comprimido	702 - 739	70,2 - 73,9	96 - 107	Não especificado
Unidades	g/L	%	%	%
Líquido 1	29 - 32	2,9 - 3,2	98 - 108	Não especificado
Líquido 2	139 - 148	13,9 - 14,8	92 - 106	15

Por falta de dados sobre o consumo médio de adoçantes de mesa em Portugal, não foi possível fazer uma avaliação real do impacto dos resultados determinados na exposição alimentar.

Na **tabela 2** são apresentadas as quantidades máximas aproximadas de cada um dos adoçantes de mesa analisados que, ao serem consumidas diariamente por um adulto ou por uma criança, implicariam atingir a DDA do ciclamato.

Tabela 2: Quantidade de adoçante de mesa necessário para atingir a DDA do ciclamato.

Adoçante de mesa	Adulto (M/F) ^a	Criança (M/F) ^b
Granulado (gramas)	6,7	3,3
Comprimidos (unidades)	12	6
Líquido 1 (gotas)	650	318
Líquido 2 (gotas)	112	55

^a Com peso médio de 66,4 kg, altura média de 1,70 m e índice de massa corporal de 23⁽⁵⁾

^b De 10 anos com peso médio de 32,5 kg (percentil 50)

Analisando a **tabela 2** conclui-se que a quantidade hipotética de produto necessária para atingir a DDA varia consideravelmente com o tipo de adoçante, sendo o produto em comprimidos aquele cujo consumo aparenta maior risco de incumprimento da DDA. Neste caso, seriam apenas necessários cerca de 12 e 6 comprimidos por dia para atingir o limite máximo diário para um adulto ou uma criança, respetivamente.

Estes valores, por si só, não aparentam colocar em risco a saúde do consumidor comum. No entanto, se forem considerados consumidores diabéticos, mais propensos a ingerir este tipo de pro-

duto diariamente, pode afirmar-se que existem marcas de adoçantes de mesa no mercado cujo consumo põe em risco o cumprimento da DDA de ciclamato. É importante, também, referir que a ingestão desta dose hipotética exclui a contribuição de outras possíveis fontes de ciclamato de sódio, que podem ser contabilizadas em estudos de estimativa da ingestão deste edulcorante (refrigerantes).

Conclusões

A partir deste estudo chegou-se à conclusão que existe uma grande variação no teor de ciclamato nos diferentes adoçantes de mesa. Verificou-se, ainda que, numa das amostras analisadas (adoçante em comprimidos), o risco do seu consumo ultrapassar a DDA constitui uma possibilidade real.

A larga gama de concentração de ciclamato que foi encontrada indica que o conteúdo real deste edulcorante num determinado adoçante de mesa depende de um conjunto de variáveis não controladas, tais como formulação do produto e tipo de matriz em produção. Deste modo, seria aconselhável que os produtores alimentares incluíssem no rótulo o teor em ciclamato, de modo a permitir ao consumidor controlar a sua ingestão de forma informada.

É de salientar a importância que teria a realização de inquéritos ao consumo deste tipo de produtos no país (inexistentes até à data) para estimar a ingestão deste edulcorante. Se existisse risco de exceder a DDA de ciclamato pela população ao consumir adoçantes de mesa disponíveis no mercado em Portugal, este estudo seria um contributo importante para a possível alteração da legislação relativa à produção e comercialização de adoçantes de mesa.



artigos breves_ n. 9

Referências bibliográficas:

- (1) Nabors LO. Alternative Sweeteners: An Overview. In: Nabors LO (ed.). Alternative Sweeteners. 4th ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2012. p. 1-10. [LINK](#)
- (2) Comissão Europeia. Diretiva 94/35/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 30 de junho de 1994, relativa aos edulcorantes para utilização nos géneros alimentares. JO L 237/3-12; 10.9.1994. [LINK](#)
- (3) European Commission. Health & Consumer Protection Directorate-General. Scientific Committee on Food. Revised opinion on cyclamic acid and its sodium and calcium salts (expressed on 9 March 2000). Brussels: EC, 2000. (SCF/CS/EDUL/192 final 13 March 2000). [LINK](#)
- (4) Sargaço B. Otimização e validação de um método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) para a determinação do edulcorante ciclamato. Ocorrência em adoçantes de mesa. Dissertação de Mestrado, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 2014. [LINK](#)
- (5) Direção-Geral de Saúde. Circular Normativa nº 05/DSMIA, de 21/02/2006. Consultas de vigilância de Saúde Infantil e Juvenil: atualização das curvas de crescimento. [LINK](#)



notícia_

Projeto europeu ASDEU

Autism Spectrum Disorders in Europe

O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge integra o grupo de instituições que vão estudar o autismo na Europa e a forma de melhorar o apoio a estes doentes. Melhorar a qualidade de vida dos cidadãos com autismo e analisar de forma abrangente a atual situação do autismo na Europa é o objetivo do projeto europeu ASDEU (Autism Spectrum Disorders in Europe), que foi selecionado para financiamento pela Direção-Geral da Saúde e dos Consumidores (DG SANCO) da Comissão Europeia.

O autismo é um distúrbio neurológico que afeta o normal desenvolvimento da criança. Os sintomas ocorrem nos primeiros três anos de vida e incluem três grandes domínios de perturbação: social, comportamental e comunicacional, dificultando a sua integração na sociedade e o seu relacionamento com os outros.

Este projeto pretende efetuar um estudo de prevalência do autismo em 12 países da União Europeia (Dinamarca, Finlândia, Itália, Espanha, Portugal, Polónia, Roménia, Bulgária, França, Áustria, Islândia e Irlanda), bem como a análise dos custos económicos e sociais envolvidos. Além disso, os participantes nesta iniciativa vão caracterizar o estado atual de deteção precoce deste distúrbio, incluindo propostas para o desenvolvimento de programas de deteção, e formação de profissionais para estas áreas.

Um outro aspeto particularmente importante do projeto ASDEU está relacionado com a validação de biomarcadores e análise da situação no diagnóstico desta perturbação. Isto porque não existe, no estado da arte clínico atual, nenhum marcador biológico específico para identificar o autismo, sendo o mesmo diagnosticado através dos comportamentos clinicamente observáveis. Por fim, esta iniciativa europeia pretende também analisar os cuidados e apoio necessários a adultos e idosos com autismo, bem como a comorbilidade associada a esta questão de saúde.

O orçamento global do ASDEU é de 2,1 milhões de euros, assumindo o Instituto de Investigação de Doenças Raras do Instituto de Saúde Carlos III, de Espanha, a coordenação do projeto. O Instituto Ricardo Jorge, através do seu Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, é uma das entidades envolvidas neste projeto, integrado num grupo de 19 instituições de 14 países europeus. O estudo em Portugal será efetuado em parceria com o Hospital Pediátrico do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra. O ASDEU começou oficialmente no dia 15 de fevereiro de 2015 e terá a duração de 36 meses. O projeto irá ainda relacionar-se com uma outra iniciativa europeia em curso nesta área, denominada de *European Autism Interventions – a multicentre study for developing new medications* (EU-AIMS).

astrid.vicente@insa.min-saude.pt

Departamento Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, INSA.

Saiba mais sobre EU-Autistic Spectrum Disorders (ASD):

http://ec.europa.eu/health/major_chronic_diseases/diseases/autistic/index_en.htm

Saiba mais sobre EU-AIMS: <http://www.eu-aims.eu/>

ficha técnica_

_Título: Boletim Epidemiológico Observações

_Periodicidade: Trimestral

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

_Numeração: 2ª série

Volume 4, número 11

Janeiro - março 2015

_Diretor

Fernando de Almeida, Presidente do INSA

_Editores

Carlos Matias Dias, Departamento de Epidemiologia

Elvira Silvestre, Biblioteca da Saúde

_Conselho Editorial Científico

Carlos Matias Dias, Departamento de Epidemiologia

Cláudia Niza, Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis

Jorge Machado, Departamento de Doenças Infecciosas

Manuela Caniça, Conselho Científico do INSA

Manuela Cano, Departamento de Saúde Ambiental

Peter Jordan, Departamento de Genética Humana

Silvia Viegas, Departamento de Alimentação e Nutrição

_Revisão Científica

Carlos Matias Dias, Epidemiologia | Cristina Furtado, Doenças Infecciosas

Manuela Cano, Saúde Ambiental | Maria Antónia Calhau, Alimentação e

Nutrição | Peter Jordan, Genética Humana

_Coordenação técnica Elvira Silvestre, Biblioteca da Saúde

_Composição e paginação Francisco Tellechea, Biblioteca da Saúde

(segundo layout inicial de Nuno Almodovar Design, Lda.)

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

Reprodução autorizada desde que a fonte seja citada, exceto para fins comerciais.

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