



2013
número
especial 1
2ª série

Doenças Infecciosas

Lisboa_INSA, IP

Número especial 1_Doenças Infecciosas

ISSN: 2182 - 8873 (em linha)

Observações

Boletim Epidemiológico

editorial

As doenças infecciosas e os seus agentes etiológicos representam um risco grave para a saúde humana. São doenças que não respeitam fronteiras e que se podem propagar rapidamente se não forem tomadas medidas para as combater. A par do aparecimento de novas patologias como as novas formas de Síndrome Respiratória Aguda (SRA) ou de gripe, A(H7N9), outras doenças estão a desenvolver características que importa conhecer.

Portugal deve lutar contra estas ameaças da forma efetiva. A estreita colaboração entre o Instituto Nacional de Saúde (INSA) a Direção-Geral da Saúde (DGS), organismos europeus, como o Centro Europeu para a Prevenção e Controlo de Doenças (ECDC), e agências internacionais, como a Organização Mundial de Saúde (OMS), é crucial para minimizar os riscos para a Saúde Pública.

O INSA e o seu Departamento de Doenças Infecciosas têm como objetivo fundamental dispor de sistemas de vigilância laboratorial adequados e eficientes, de mecanismos de alerta, bem como de estratégias de preparação na componente laboratorial, por forma a estar pronta para enfrentar estas ameaças. A deteção rápida das doenças transmissíveis em geral e das doenças emergentes e dos respetivos surtos, bem como a partilha de informações, são elementos cruciais para uma resposta adequada a nível nacional.

A existência de uma publicação que permite de forma simples mas objetiva fornecer informação pertinente incluindo nesta área a vigilância epidemiológica em doenças infecciosas contribui para um melhor conhecimento da realidade nacional. Assim, este número especial do Boletim Epidemiológico do INSA inclui pequenos artigos relacionados com alguns dos agentes responsáveis de doenças evitáveis pela vacinação, infeções respiratórias e gastrointestinais que esperamos possam fornecer informação para melhor prevenir e tratar a população portuguesa.

Jorge Machado (Coordenador do Departamento de Doenças Infecciosas do INSA)



Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge

neste número

Editorial Jorge Machado

p 01

Artigos Breves

Doenças Evitáveis pela Vacinação

1. Tosse convulsa em Portugal: reemergente?

M Augusta Santos

p 02

2. Monitorização da infeção a *Haemophilus influenzae* em crianças após a introdução da vacina para o *Haemophilus influenzae* serotipo b no Programa Nacional de Vacinação

MP Bajanca-Lavado, C Betencourt, P Cristóvão

p 04

3. Parotidite epidémica em adolescentes vacinados entre 2012-2013

Paula Palminha, Elsa Vinagre, Eugénio Cordeiro, Carlos Ribeiro, Carla Roque

p 07

Infeções Respiratórias

4. Aplicação dos testes IGRA na deteção de tuberculose latente: o geral e o particular

J Rodrigues, C Betencourt, I João, K Sarioglou, L Reis, P Cristóvão, S Graça, L Jordão

p 08

5. Perfil de suscetibilidade do vírus *influenza* aos antivirais específicos para a gripe de 2004 a 2011

Vanessa Correia, Luis André Santos, Helena Rebelo de Andrade

p 11

Infeções Gastrointestinais

6. Infeções por *Salmonella enterica* no período entre 2000-2012

Leonor Silveira, Adelaide Marques, Jorge Machado

p 14

7. A infeção humana por *Campylobacter* em Portugal: alguns dados epidemiológicos

A Duarte, A Santos, J Benoliel, F Domingues, M Oleastro

p 17

8. Patótipos de *Escherichia coli* associados a infeções entéricas entre 2002-2012

Leonor Silveira, Adelaide Marques, Jorge Machado

p 20

9. Frequência de infeção por *Giardia duodenalis* e fatores de risco associados na população pediátrica do distrito de Lisboa

Cláudia Júlio

p 23

10. Deteção molecular de *V. cholerae* O1 e O139 e caracterização genotípica dos fatores de virulência em estirpes clínicas de *V. cholerae* isoladas em Angola: resultados preliminares

L Monteiro, F Reis Van-Dúnem, A Vilares, J Sami, E Oliveira, F Gomes da Silva

p 25

artigos breves_ n. 1

Doenças Evitáveis pela Vacinação

Tosse convulsa em Portugal: reemergente

Maria Augusta Santos m.augusta.santos@insa.min-saude.pt

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

A tosse convulsa é uma infeção respiratória transmitida por uma bactéria Gram negativa, aeróbia, a *Bordetella pertussis* que também produz uma vasta gama de fatores de virulência, os quais contribuem para a patogénese da doença ⁽¹⁾.

Esta doença respiratória foi responsável por elevadas taxas de mortalidade e morbilidade à escala mundial em recém-nascidos e crianças, até à introdução da vacinação nos anos 40 do século XX ⁽²⁾, e por este facto principalmente em países desenvolvidos, registou-se uma diminuição da sua incidência.

Contudo, apesar das elevadas coberturas vacinais, a tosse convulsa tem uma incidência global elevada, continuando a ocorrer mortes, estimando a OMS que das 2.1 milhões de mortes por doenças evitáveis pela vacinação, 294.000 são por tosse convulsa, o que coloca esta doença respiratória, como uma das dez mais comuns causas de morte por doença infecciosa à escala mundial ⁽³⁾.

Em Portugal a vacina para prevenir a tosse convulsa foi introduzida em 1965 no Plano Nacional de Vacinação, observando-se pelo facto um acentuado decréscimo de notificação da doença, mas na última década e apesar da elevada cobertura vacinal também se tem registado um significativo aumento de número de casos ^(4, 5, 6).

O Laboratório de Bordetella da Unidade de Referência das Doenças Evitáveis por Vacinação do Departamento de Doenças Infecciosas do INSA IP no Porto, no âmbito das funções que lhe estão atribuídas, não só confirma laboratorialmente ⁽⁷⁾ os casos de *Bordetella pertussis* em produtos biológicos que lhe são enviados pelos hospitais do continente e Ilhas, tendo pelo facto constatado ao longo dos três últimos anos, um aumento de casos de tosse convulsa e nomeadamente em 2012 um aumento com alguma relevância ^(Gráfico 1), bem como procede à notificação de base laboratorial destes casos, à Direção Geral de Saúde com quem colabora ^(Tabela 1).

Gráfico 1 : Distribuição dos casos de tosse convulsa entre 2010 e 2012.

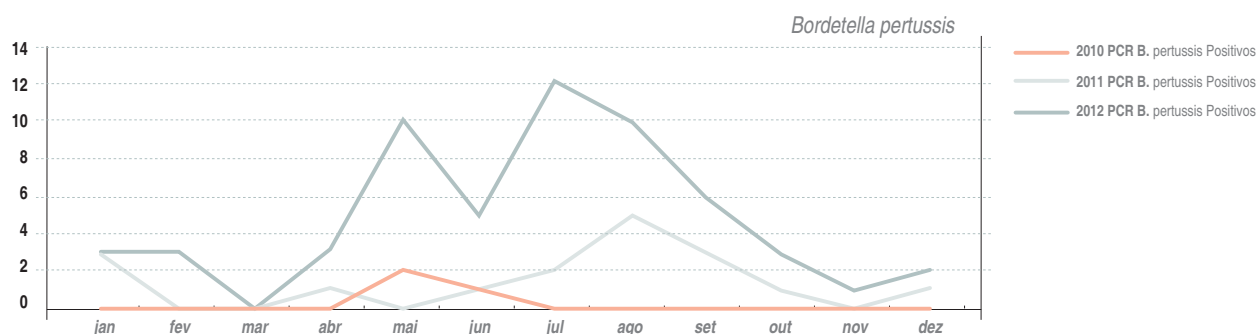


Tabela 1: Notificação de base laboratorial dos casos tosse convulsa entre 2010-2012.

Ano	jan	fev	mar	abr	mai	jun	jul	ago	set	out	nov	dez
2010					2	1						
2011	3			1		1	2	5	3	1		1
2012	3	3		3	10	5	12	10	6	3	1	2

→ continua

artigos breves_ n. 1

A distribuição destes casos de tosse convulsa pelos diferentes grupos etários, sobretudo no ano de 2012, confirma o detetado a nível mundial porquanto evidencia um aumento relevante de casos nos vários grupos, mas principalmente no grupo dos lactentes, sendo de assinalar uma maior incidência na faixa etária compreendida entre o primeiro e segundo mês de idade (*Gráfico 2*), na qual não existe qualquer primo-vacinação, bem como também na faixa etária com idade superior a 13 anos se constata um aumento, facto referido na literatura científica relativamente aos adolescentes e adultos (8,9).

A tosse convulsa pela sua dinâmica de transmissão continua a ser um problema de saúde pública, com uma dimensão que aponta a necessidade de serem desenvolvidas estratégias, que poderão eventualmente passar pela introdução de vacinação na adolescência, situação já salvaguardada em alguns países, bem como a vacinação durante a gravidez após as 20 semanas de gestação, o que permitiria proteção e modificaria a severidade da doença nos recém-nascidos (10,11,12).

O INSA através desta unidade laboratorial de referência, pode contribuir para um melhor conhecimento da circulação do agente, criando evidências para tomada de decisão.

Gráfico 2: Distribuição por grupo etário dos casos positivos de *Bordetella pertussis*.



Referências bibliográficas:

- (1) Loeffelholz MJ. *Bordetella*. In: Manual of Clinical Microbiology (eds. PR Murray, EJ Baron, JH Jorgensen, et al.). 8th ed. Washington DC: American Society for Microbiology, 2003.
- (2) Anderson RM, May RM, Anderson B. *Infectious diseases of humans: dynamics and control*. Oxford: University Press, 1991.
- (3) World Health Organization. WHO position paper: Pertussis Vaccine Weekly. *Epidemiological Record*. 1999; 74(18): 137-42.
- (4) Carvalho MC. *National Program Report for Immunization – Portugal*. Lisboa: Direção Geral de Saúde, 1989.
- (5) Gomes MC, Gomes JJ, Paulo AC. Diphtheria, pertussis and measles in Portugal before and after mass vaccination: a time series analyses. *Eur J Epidemiol*. 1999;15(9):791-798.
- (6) Gonçalves G, Machado E, Gouveia E, et al. Resurgence of pertussis in northern Portugal: two severe cases in very young children. *Eurosurveillance*. 2005; 10 (25): 4-9.
- (7) Berbers G, Fry NK, He Q, et al. Nucleic amplification tests for diagnosis of *Bordetella* infections. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(10): 4925-9.
- (8) Broutin H, Guegan JF, Elguero E, et al. Large Scale comparative analyses of pertussis population dynamics: periodicity, synchrony and impact of vaccination. *Am J Epidemiol* 2005; 161(12): 1159-1167.
- (9) Wirsing von Konig CH, Postels-Multani S, Bock HL, et al. Pertussis in adult: frequency of transmission after households exposure. *Lancet*. 1995;346(8986):1326-1329.
- (10) Centers for Disease Control and Prevention. Preventing tetanus, diphtheria, and pertussis among adolescents: use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccines. Recommendations of Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR*. 2006; 55(No RR-3).
- (11) Gall SA, Myres J, Pichichero M. Maternal immunization with tetanus-diphtheria-pertussis vaccine: effect on maternal and neonatal serum antibody levels. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;204(4):334.e1-5.
- (12) Centers for Disease Control and Prevention. Updated recommendations for use of tetanus toxoid reduced, diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccine from de Advisory Committee on Immunization Practices *MMWR*. 2011;60: 13-5.

artigos breves_ n. 2

Doenças Evitáveis pela Vacinação

Monitorização da infeção a *Haemophilus influenzae* em crianças após a introdução da vacina para o *Haemophilus influenzae* serotipo b no Programa Nacional de Vacinação

Maria Paula Bajanca Lavado, Célia Betencourt, Paula Cristóvão
paula.lavado@insa.min-saude.pt

Laboratório Nacional de Referência de Infecções Respiratórias/Agentes bacterianos,
Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

Introdução

O *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) é um microrganismo Gram negativo cujo nicho ecológico é o trato respiratório humano. Para além de colonizar a nasofaringe de pessoas saudáveis, o *H. influenzae* é normalmente responsável por infeções respiratórias e ainda infeções invasivas graves como a meningite e a septicemia, principalmente nas crianças (1). A presença ou ausência de cápsula tem sido associada à maior ou menor virulência das estirpes. As estirpes responsáveis por infeções invasivas possuem cápsula, ao contrário da maior parte das estirpes isoladas de outras infeções ou de pessoas saudáveis. Estas estirpes foram agrupadas em seis serotipos, designados de a-f.

As estirpes capsuladas, nomeadamente as de serotipo b (Hib) eram, até à introdução da vacina conjugada, responsáveis pela maior parte dos casos de infeção invasiva (2). A vacina para o Hib, licenciada em Portugal em 1994 e incluída no Programa Nacional de Vacinação (PNV) no ano 2000 para administração a crianças até aos 5 anos de idade, resultou na eliminação da quase totalidade das infeções invasivas por este serotipo nas populações onde a vacinação foi implementada (3, 4). Contudo, esta vacina não protege contra a infeção invasiva por estirpes não capsuladas (NC) ou de serotipos não b sendo, atualmente, as estirpes NC as responsáveis pela maior parte destas infeções (5, 6). A vacinação tem também impacto na ecologia da colonização do trato respiratório, assim como nos perfis de resistência aos antibióticos.

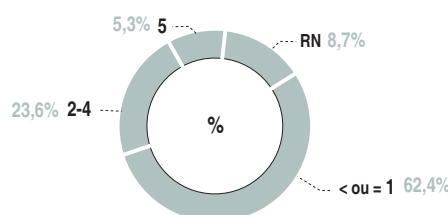
O Laboratório Nacional de Referência a Infecções Respiratórias - Agentes bacterianos, do Departamento de Doenças Infecciosas, INSA, IP, tem como uma das suas funções principais, no âmbito da referência e vigilância, a monitorização da infeção (*) por *H. influenzae*, em estreita colaboração com a Direção Geral de Saúde e com o "European Center for Disease Prevention and Control", sendo responsável por caracterizar todas as estirpes isoladas de infeção invasiva, divulgando os resultados às Autoridades de Saúde competentes.

O objetivo deste estudo é monitorizar a infeção a *H. influenzae* após a introdução da vacina Hib no nosso país, através da caracterização de estirpes isoladas entre 2001 e 2012 de crianças em idade pré-escolar (< ou = 5 anos), dando destaque ao serotipo capsular e à resistência aos agentes antimicrobianos.

Material e Métodos

Caracterizaram-se 1742 estirpes de *H. influenzae* isoladas no período pós vacinal, de crianças com idade igual ou inferior a 5 anos (Gráfico 1) em 30 Laboratórios Hospitalares em Portugal. Destes, apenas 16 Laboratórios (**) tiveram uma participação mais ativa na vigilância desta infeção, enviando 5 ou mais estirpes para caracterização.

Gráfico 1: Distribuição por grupo etário.

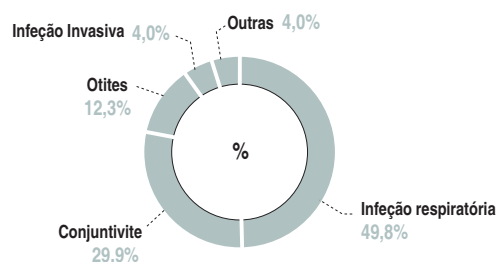


A produção de β -lactamase foi pesquisada pelo método colorimétrico, utilizando nitrocefina como substrato. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM, mg/L) foi realizada pelo método de microdiluição em placa (Siemens Healthcare Diagnostics Inc. USA) para 13 antibióticos (ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefaclor, cefuroxima, ceftriaxone, cefepime, meropenem, cloranfenicol, tetraciclina, rifampicina, trimetoprim/sulfametoxazol, ciprofloxacina e azitromicina); os "breakpoints" utilizados foram os estabelecidos pelo CLSI (7). Foi efetuada a pesquisa de cápsula e caracterizado o serotipo capsular por "Polymerase Chain Reaction" (8).

Resultados

Da amostra analisada verificou-se que as infeções mais comuns foram as infeções respiratórias com 49,8% dos casos. Seguiram-se as conjuntivites (29,9%), e as otites (12,3%). A infeção invasiva foi, como esperado, a menos frequente representando apenas 4% do total de infeções em crianças (Gráfico 2).

Gráfico 2: Tipo de infeção.



→ continua

artigos breves_ n. 2

A resistência à ampicilina por produção de β -lactamase foi observada em 12,5% das amostras. Entre as estirpes não produtoras de β -lactamase, 2,2% demonstraram uma suscetibilidade diminuída à ampicilina e à amoxicilina/ácido clavulânico (CIM > ou = 2 mg/L) assim como às cefalosporinas. Estas estirpes designam-se por BLNAR (β -lactamase negativas e resistentes à ampicilina) pela sua diminuição de afinidade aos antibióticos β -lactâmicos devido a mutações no gene *ftsI* que codifica a PBP3 (9). Ainda relativamente à suscetibilidade aos antibióticos (considerando as estirpes de suscetibilidade intermédia e as resistentes) salienta-se 16,6% de resistência à ampicilina, 9,5% ao cefaclor, 4,3% à cefuroxima e 30% de resistência ao trimetoprim/sulfametoxazol. Há a referir a ausência de estirpes resistentes às cefalosporinas de 3ª geração (cefotaxime) e 4ª geração (cefepime), assim como à ciprofloxacina (Gráfico 3).

Em relação ao serotipo capsular, a grande maioria (98,3%) das estirpes eram não capsuladas. A pequena percentagem (1,7%) de estirpes que apresentam cápsula abrangeu todos os serotipos capsulares com exclusão do serotipo c. Uma estirpe de serotipo d foi pela primeira vez caracterizada em 2009 num latente com meningite, não sendo conhecido até então qualquer caso de uma infeção invasiva por *H. influenzae* serotipo d na Europa (10).

Discussão

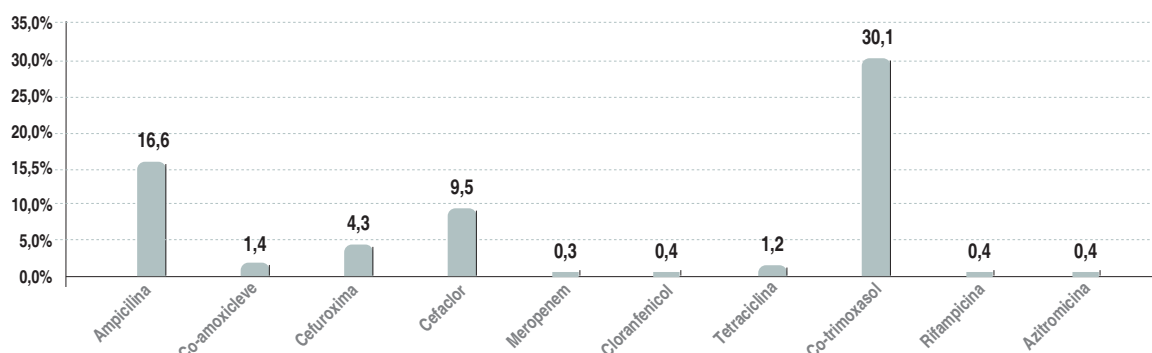
Desde a implementação da vacina Hib que a epidemiologia das infeções a *H. influenzae* tem sofrido alterações. Nas décadas de 80-90, o *H. influenzae* tipo b era responsável por mais de 90% dos casos de infeção invasiva em crianças, apresentando com elevada frequência um perfil de multiresistência a 3 ou mais antibióticos (ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol e por vezes trimetoprim/sulfametoxazol). As estirpes NC eram nessa altura responsáveis por infeções de menor gravidade (11).

Como consequência da introdução da vacina, observou-se não só a diminuição na circulação do serotipo b como ainda a diminuição no número de estirpes com perfil de multiresistência. Observou-se também uma diminuição drástica da infeção invasiva, assim como uma quase eliminação das meningites associadas a este agente. As estirpes NC são atualmente responsáveis pela maior parte das infeções, incluindo as invasivas. Outros serotipos (a, d, e, f) têm sido caracterizados em todo o tipo de infeções (4, 10, 12). Com efeito, no nosso Laboratório foi caracterizada, pela primeira vez, em 2001 uma estirpe invasiva de serotipo não b (serotipo f) isolada de um doente de 91 anos de idade (4).

Relativamente à resistência à ampicilina, por produção de β -lactamase, a percentagem tem variado anualmente entre 10 a 13 %, não havendo alterações a assinalar em relação a este mecanismo de resistência. Contudo, o fenótipo de resistência BLNAR só foi detetado no período pós-vacinal, o que indica uma alteração no mecanismo de resistência não enzimática aos antibióticos β -lactâmicos. Nos nossos estudos de vigilância o fenótipo de multiresistência foi caracterizado pela última vez em 1994.

O trabalho desenvolvido revela uma alteração na epidemiologia da infeção a *H. influenzae* doze anos após a introdução da vacina Hib, com um aumento de estirpes NC e a caracterização de outros serotipos circulantes. Por esta razão torna-se essencial a continuidade desta monitorização através de mais e melhores estudos de vigilância.

Gráfico 3: Resistência aos antibióticos (n=1445)



Meropenem e Azitomicina: as percentagens só incluem estirpes de suscetibilidade intermédia.

→ continua

artigos breves_ n. 1

Referências bibliográficas:

- (1) Tristram S, Jacobs M, Appelbaum P. Antimicrobial Resistance in *Haemophilus influenzae*. Clin Microbiol Rev. 2007; 20: 368-69.
- (2) Peltola H. *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. Clin Microbiol Rev. 2000;13:302-17.
- (3) Wenger J. Epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b disease and impact of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines in the United States and Canada. Pediatr Infect Dis J. 1998;17(9 Suppl): S132-6.
- (4) Bajanca, P, Caniça M, Multicenter Study Group. Emergence of noncapsulated and encapsulated non-b-type invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Portugal (1989-2001). J Clin Microbiol. 2004;42:807-810.
- (5) Ladhani S, Slack M, Heath P, et al. Invasive *Haemophilus influenzae* disease, Europe, 1996-2006. Emerg Infect Dis. 2010;16:455-63.
- (6) Ulanova M, Tsang R. Invasive *Haemophilus influenzae* disease: changing epidemiology and host-parasite interactions in the 21st century. Infect Genet Evo. 2009;9:594-605.
- (7) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth informational supplement M100-S19. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
- (8) Falla T, Crook D, Brophy L, et al. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol. 1994; 32:2382-86.
- (9) Barbosa R, Giufrè M, Cerquetti M, et al. Polymorphism in *ftsI* gene and β -lactam susceptibility in Portuguese *Haemophilus influenzae* strains: clonal dissemination of β -lactamase-positive isolates with decreased susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid. J Antimicrob Chemother. 2011;66:788-96.
- (10) Calado R, Betencourt C, Gonçalves H, et al. Complicated meningitis caused by a rare serotype of *Haemophilus influenzae* in Portugal. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;69:111-13.
- (11) Bajanca Lavado MP. Contribuição para o estudo da susceptibilidade aos antibióticos e dos mecanismos de resistência em estirpes de *Haemophilus influenzae* isoladas em Portugal. Porto, 1997. Tese de Doutoramento apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto.
- (12) Bajanca P, Teixeira F, Caniça M. Nosocomial cross-infection of a child with cystic fibrosis with *Haemophilus influenzae* serotype e. [letter to the editor]. J Hosp Infect. 2005;60:185-186.

(*) Até início de 2009, este estudo de vigilância foi realizado no Laboratório anteriormente designado por Unidade de Resistência aos Antibióticos.

(**) Laboratórios participantes:

Centro Hospitalar Barreiro-Montijo, EPE (A. Jesus)
 Centro Hospitalar de Coimbra, EPE (L. Albuquerque)
 Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho, EPE (L. Felício)
 Hospital Cuf Descobertas (A. Neto)
 Hospital Dona Estefânia (R. Ramos)
 Hospital Espírito Santo (Laboratório de Bacteriologia)
 Hospital Fernando da Fonseca, EPE (L. Sancho)
 Hospital Garcia da Orta (J. Diogo)
 Hospital Maria Pia (F. Teixeira)
 Hospital Santa Luzia, Viana do Castelo (A. Santos)
 Hospital Santa Maria (J. Melo Cristino, L. Lito, L. Monteiro, A. Fonseca)
 Hospital Santo António (Laboratório de Bacteriologia)
 Hospital São Francisco Xavier (F. Martins)
 Hospital São Teotónio (J. Ribeiro)
 Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP (Laboratórios de Bacteriologia, Lisboa/Porto)

artigos breves_ n. 3

Doenças Evitáveis pela Vacinação

Parotidite epidémica em adolescentes vacinados entre 2012-2013

Paula Palminha¹, Elsa Vinagre¹, Eugénio Cordeiro²,
Carlos Ribeiro¹, Carla Roque¹
paula.palminha@insa.min-saude.pt

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

(2) Departamento de Saúde Pública, Administração Regional de Saúde do Centro.

A parotidite epidémica (papeira) é uma doença contagiosa causada por um vírus de RNA (vírus da parotidite epidémica) pertencente à família Paramixovírus, género Rubulavirus. Este é um vírus de transmissão aérea que se propaga de pessoa para pessoa através de contacto com secreções respiratórias (1).

O vírus da parotidite epidémica tem apenas um serotipo, mas possui variação genotípica tendo sido identificados 12 genótipos (A, B, C, D, F, G, H, I, J, K, L, N), com base na variação genómica do gene SH, (2,3,4).

A vacina contra o Sarampo, Parotidite e Rubéola (VASPR) foi introduzida em Portugal em 1987 contendo como vacina contra a parotidite a estirpe Rubini. No entanto, desde a sua introdução e apesar da sua elevada cobertura vacinal (> 95% desde 1992) o número de casos de parotidite notificados foi sempre elevado tendo variado entre o mínimo de 140 em 2008 e o máximo de 19415 em 1997 resultante do surto que ocorreu nesse ano e que atingiu crianças vacinadas (5,6,7). Este surto levou à alteração da composição da VASPR tendo a estirpe Rubini sido substituída pela Jeryl-Lynn a qual tem sido administrada desde então.

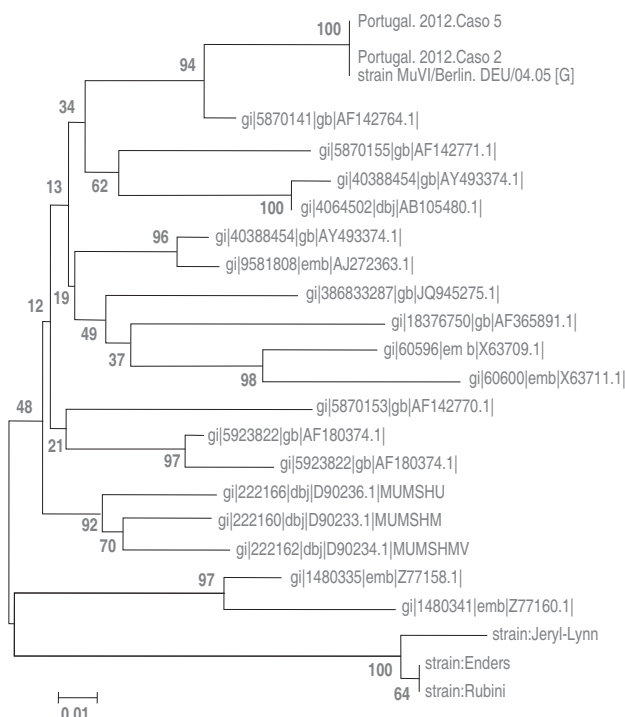
Entre novembro de 2012 e janeiro de 2013 foram notificados 48 casos de parotidite epidémica em 2 escolas dos concelhos de Anadia e Mealhada em que 98% dos casos ocorreram em adolescentes vacinados. Todos os adolescentes possuíam 2 doses de VASPR mas com composições vacinais diferentes em que a primeira dose continha a estirpe Rubini e a segunda a Jeryl-Lynn.

O Laboratório Nacional de Referência de Doenças Evitáveis pela Vacinação do INSA efetuou a confirmação laboratorial dos 6 primeiros casos que ocorreram na Escola Secundária da Anadia. Todos os 6 casos analisados apresentavam anticorpos IgM contra o vírus da Parotidite epidémica tendo o RNA deste vírus sido detetado em 2 casos. Foram igualmente efetuados estudos moleculares de sequenciação que permitiram identificar o vírus responsável por este surto o qual pertence ao genótipo G (Figura 1).

A distância filogeneticamente entre este vírus correspondente ao genótipo G e as estirpes vacinais administradas, as quais pertencem ao genótipo A; bem como a eficácia destas estirpes, que em situações de surtos, variam entre 61,6% a 70% para a Jeryl-Lynn e 0% a 12,4%

para Rubini (8) poderá explicar o elevado número de casos deste surto. No entanto, estudos adicionais são necessários para um melhor esclarecimento desta falência vacinal.

Figura 1: Árvore filogenética efetuada com as sequências genómicas dos diversos genótipos, dos vírus de Parotidite Epidémica, incluindo os casos identificados no surto de 2012-2013 em adolescentes vacinados.



Agradecimentos

Os autores agradecem aos pacientes e à equipa de saúde pública, que com os produtos biológicos e inquérito epidemiológico contribuíram para realização deste trabalho, bem como à Dra. Rita Cordeiro pela preciosa ajuda na análise das sequências genómicas e construção da árvore filogenética.

Referências bibliográficas:

- (1) Carbone KM, Rubin S. Mumps virus. In: Fields virology (eds. DM Knipe, PM Howley). 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 1527-50.
- (2) Jin L, Beard S, Brown DW. Genetic Heterogeneity of Mumps Virus in the United Kingdom: Identification of Two New Genotypes. J Infect Dis. 1999;180(3):829-33.
- (3) Jin L, Brown DW, Litton PA, et al. Genetic diversity of mumps virus in oral fluid specimens: application to mumps epidemiological study. J Infect Dis. 2004 Mar 15;189(6):1001-8.
- (4) Jin L, Rima B, Brown D, et al. Proposal for genetic characterisation of wild-type mumps strains: preliminary standardisation of the nomenclature. Arch Virol. 2005;150(9):1903-9.
- (5) Direcção Geral da Saúde. Doenças de Declaração Obrigatória 1997-2001. Lisboa: DGS, 2002:34.
- (6) Direcção Geral da Saúde. Doenças de Declaração Obrigatória 2004-2008. Lisboa: DGS, 2010:79.
- (7) Rebelo-de-Andrade H; Gíria M. Vírus da Parotidite Epidémica. In Direcção Geral da Saúde. Avaliação do programa nacional de vacinação e melhoria do seu custo-efectividade: 2º Inquérito Serológico Nacional Portugal Continental 2001-2002. Lisboa: DGS, 2004: 147-158.
- (8) Chamot E, Toscani L, Egger P, et al. [Estimation of the efficacy of three strains of mumps vaccines during an epidemic of mumps in the Geneva canton (Switzerland)]. Rev Epidemiol Sante Publique. 1998 Mar;46(2):100-7.

Aplicação dos testes IGRA na deteção de tuberculose latente: o geral e o particular

João Rodrigues¹, Célia Betencourt¹, Inês João¹,
Konstantina Sarioglou¹, Lúcia Reis¹, Paula Cristóvão¹,
Silva Graça² e Luísa Jordão¹
maria.jordao@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(2) Núcleo de Saúde no Trabalho.

Gabinete de Segurança, Ambiente, Higiene e Saúde no Trabalho, INSA.

Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa que representa um grave problema de saúde pública. Em 2011, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), foram registados 8,7 milhões de novos casos de TB e 1,4 milhões de mortes⁽¹⁾. A acrescer a estes números preocupantes está a elevada prevalência de TB latente ($\approx 1/3$ População mundial). Um indivíduo com tuberculose latente está infetado com o agente etiológico da TB, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), mas ainda não desenvolveu a doença nem é capaz de a transmitir⁽¹⁾. Contudo, uma vez que cerca de 10% dos casos de TB latente podem evoluir para TB ativa esta constitui um reservatório de infeção e um obstáculo a erradicação da doença⁽²⁾.

A deteção da tuberculose latente é por isso uma prioridade. Durante muito tempo a prova cutânea da tuberculina (TST) era o único método de diagnóstico. Este teste consiste na injeção subcutânea, na região do antebraço, duma pequena dose de derivados proteicos purificados de tuberculina e na medição da induração resultante decorridas 48 a 72 horas. O método apresenta a vantagem de ser economicamente acessível. Contudo, é pouco específico, apresentando reação cruzada com o bacilo de *Calmette-Guérin* (BCG-vacina da TB) e outras micobactérias não tuberculosas, requer no mínimo duas idas ao médico e a sua repetida utilização num mesmo indivíduo leva ao efeito de *boosting*⁽³⁾. Todas estas dificuldades levaram a que fossem desenvolvidas alternativas.

Os testes de libertação de interferão gama (testes IGRA) foram desenvolvidos para detetar tuberculose latente. Atualmente estão disponíveis em Portugal duas variantes: *Quantiferon gold* (Cellestis) e TSPOT-TB (Oxford-ImmuneTech). Estes testes avaliam a produção de interferão gama (IFN- γ), por uma técnica de ELISA (Quantiferon) ou ELISPOT (TSPOT-TB), em resposta à estimulação por antígenos específicos de Mtb. Dois dos antígenos, ESAT-6 (do inglês *early secreted antigen target-6*) e CFP10 (do inglês *culture filtrate protein 10*), codificados pela região de diferença 1 (RD1) presente no Mtb mas ausente no BCG, são comuns aos dois testes⁽⁴⁾. O *Quantiferon gold* apresenta ainda um terceiro antígeno, TB7.7, codificado por uma

inserção presente apenas no genoma do Mtb⁽⁵⁾. A seletividade e especificidade apresentada por estes testes são muito superiores à da TST, a repetição do teste não apresenta um risco de *boosting* e não requerem mais do que uma ida ao médico. Contudo, o seu custo relativamente elevado e a necessidade de equipamento laboratorial mais sofisticado limitam a sua utilização. Estes testes também não permitem diferenciar tuberculose latente de tuberculose ativa.

Os testes IGRA constituem uma mais-valia na deteção de TB latente em populações vacinadas com BCG. A OMS recomenda ainda estes testes no rastreio de TB latente em populações específicas, como os profissionais de saúde, com um risco acrescido de contraírem a doença em países com um nível de rendimento médio a elevado⁽⁶⁾.

Métodos

Neste estudo comparámos os resultados dos testes IGRA obtidos em duas populações distintas: a população em geral (testes realizados ao longo de 3 anos) e os funcionários do departamento de doenças infecciosas do INSA. Estes foram divididos em grupos de risco de acordo com a sua exposição profissional ao Mtb. Os que contactam com utentes no serviço de colheita e/ou com amostras respiratórias, foram considerados de risco elevado (31 indivíduos) e selecionados para integrar este estudo.

A participação no estudo compreendeu o preenchimento de um inquérito e a realização do teste IGRA. A análise foi efetuada de acordo com as instruções do fabricante e os resultados foram classificados em positivos (reativos), negativos (não reativos) e indeterminados. No caso dum resultado positivo ou indeterminado foi realizado um segundo teste, decorrido o tempo preconizado pela diretiva da direção geral de saúde⁽⁷⁾, e realizados outros exames médicos para exclusão de TB ativa, quando aplicável.

Resultados e Discussão

Utilização dos testes IGRA na comunidade: a aplicação geral

O teste IGRA que consiste na avaliação da produção de IFN- γ em resposta a antígenos específicos de Mtb por ELISPOT foi introduzido no INSA em 2009. Neste período de tempo o teste foi solicitado para indivíduos residentes em todos os distritos do continente, com exceção de Viana do Castelo, e regiões autónomas da Madeira e Açores. A maioria dos pedidos (50,8%) foi efetuada para residentes em Lisboa, seguida de dois concelhos limítrofes Setúbal (9,1%) e Santarém (6,9%). O terceiro lugar de Santarém é contudo partilhado com a região autónoma dos Açores. O lugar ocupado por esta região ultraperiférica, demonstra que a distância entre a unidade de saúde requisitante e o laboratório onde a análise é efetuada, não inviabiliza a realização do teste.

→ continua

artigos breves_ n. 4

A análise foi solicitada para todos os grupos etários da população, contudo a mediana das idades é de 51 anos. O número de requisições aumenta com a idade dos indivíduos como se pode observar no **Gráfico 1**.

A exclusão de tuberculose (57,4%), pesquisa de TB latente em indivíduos imunodeprimidos por razões diversas (32,2%), rastreio de TB (4,1%) e seguimento de indivíduos com testes positivos em rastreios anteriores (4,1%) foram as razões que levaram os clínicos a solicitar o teste. A utilização destes testes em indivíduos imunodeprimidos por razões tão diversas como a infeção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), doença oncológica e imunossupressão induzida por fármacos deve ser realçada uma vez que é uma ferramenta de valor inestimável na prevenção da reativação da TB.

Testes IGRA no rastreio de TB em profissionais de saúde: a aplicação particular

A distribuição etária dos participantes no rastreio é compatível com uma população em idade ativa com uma mediana igual a 40 anos (**Gráfico 1**). A maioria dos participantes (93,5%) foi vacinada com a BCG na infância, com exceção de um que foi vacinado aos 20 anos.

O contributo de fatores extraprofissionais no eventual contato com o Mtb e existência prévia de patologia facilitadora da infeção foi avaliado através de um inquérito. Os resultados são apresentados na **Quadro 1**.

Gráfico 1: Distribuição etária e testes IGRA.

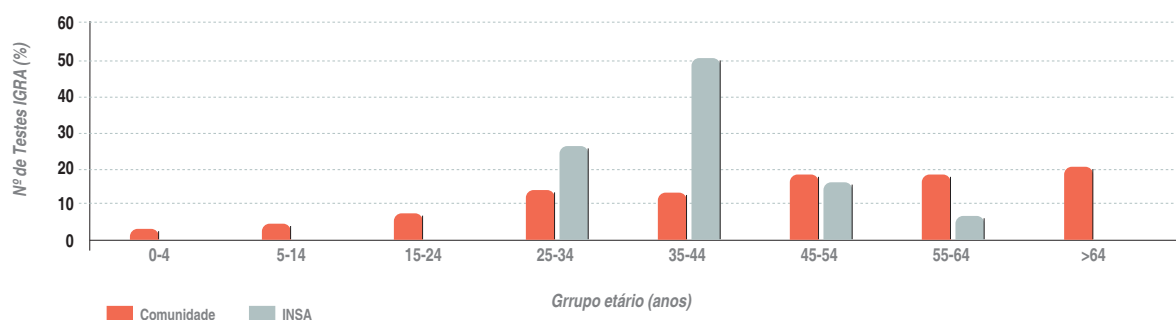


Tabela 1: Características clínicas e demográficas da população em estudo.

1. Distrito de residência			
	Lisboa	Setúbal	Leiria
Nº ind. (%)	80,6	16,2	3,2
1.1. Já residiu em outro distrito?			
	Sim	Não	
Nº ind. (%)	45,0	55,0	
2. Foi vacinado com a BCG?			
	Sim	Não	Não sabe
Nº ind. (%)	93,5	6,5	0
3. Foi-lhe diagnosticada anteriormente TB?			
	Sim	Não	Não sabe
Nº ind. (%)	6,5	93,5	0
4. Contacta com alguém com TB?			
	Sim	Não	Não sabe
Nº ind. (%)	6,4	67,8	25,8
5. Padece de alguma patologia?			
	Sim	Não	
Nº ind. (%)	80,6	19,4	

Nº ind.: Número de indivíduos

→ continua

artigos breves_ n. 4

Embora as assimetrias geográficas da incidência da TB se tenham esbatido nos últimos anos, ainda existem alguns distritos com uma incidência superior à média. Estes distritos são Porto (32/10⁵), Lisboa (29/10⁵), Beja (24/10⁵), Faro (23/10⁵) e Setúbal (22/10⁵) (8). Assim, o facto de um indivíduo residir num distrito com maior incidência de TB aumenta a probabilidade de contactar com um doente. Os funcionários que participaram no rastreio residem atualmente no distrito de Lisboa (80,6%) e em dois distritos limítrofes, Setúbal (16,1%) e Leiria (3,2%). Em 45% dos casos os indivíduos já residiram em outro distrito. A maioria dos participantes migrou de um distrito com menor incidência de tuberculose para um com maior incidência (Lisboa ou Setúbal). Apenas em um caso houve uma migração no sentido inverso de Faro para Leiria.

Em dois dos participantes (6,5%) já tinha sido diagnosticada anteriormente TB. O mesmo número de participantes (6,5%) tinha anteriormente contactado, no seu círculo privado, com alguém a quem tinha sido diagnosticada TB; os restantes desconheciam se tinham tido qualquer contato. Uma vez que algumas patologias podem favorecer o desenvolvimento de tuberculose ativa, ou de uma reativação, este aspeto também foi contemplado no inquérito. A maioria dos participantes (80,6%) não sofria de qualquer patologia. Os restantes mencionaram patologias diversas, contudo, apenas 6,4% padeciam de patologias que poderiam potenciar o desenvolvimento de TB.

A maioria dos indivíduos apresenta um teste IGRA com resultado negativo (80,6%), 3,2% com resultado indeterminado e 16,2% com resultado positivo. Estes resultados revelam a prevalência de testes IGRA negativos em profissionais de saúde, estando de acordo com os de um estudo realizado no hospital de São João, no Porto (9, 10). Em ambos os estudos a prevalência de testes negativos numa população de alto risco vacinada com BCG evidencia a elevada seletividade da análise.

Uma vez que a idade é um fator de risco para o desenvolvimento de TB, de seguida analisamos os resultados do teste IGRA em função do grupo etário (Gráfico 2). Esta análise permitiu-nos concluir que a percentagem de testes positivos aumenta com a idade do indivíduo.

Os grupos etários dos 45-54 e 55-64 anos registam uma percentagem mais elevada de resultados positivos. Uma exposição profissional mais prolongada ao Mtb poderá contribuir para este resultado. No entanto, outros fatores externos ao ambiente laboral também contribuem para os resultados. Dois dos participantes com um teste positivo apresentavam fatores de risco adicionais. Um tinha contato no círculo privado com indivíduos com um diagnóstico de TB e outro sofria duma patologia que o tornava mais vulnerável.

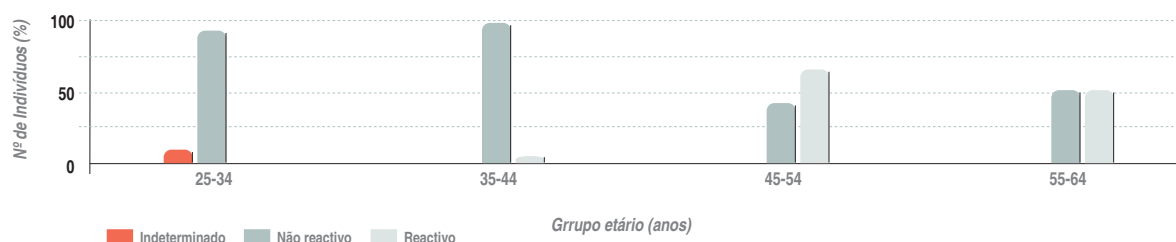
Conclusão

Os testes IGRA representam uma mais-valia no rastreio de TB latente. A sua elevada especificidade e seletividade fazem com que sejam a escolha de eleição para populações vacinadas com BCG, em elevado risco de exposição ao agente ou que apresentem depressão do sistema imunitário.

Referências bibliográficas:

- (1) World Health Organization. Tuberculosis: Facts sheet nº 104. Genève: WHO, 2012 [consul. 18-4-2013]. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>
- (2) Stewart GR, Robertson BD, Young DB. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nat Rev Microbiol.* 2003; 1: 97-105.
- (3) Centers for Disease Control and Prevention. TB Elimination. Tuberculin Skin Testing [Em linha]. Atlanta: CDC, 2011 [consul. 18-4-2013]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/tb/publications/factsheets/testing/skin-testing.pdf>
- (4) Pai M, Rileu LW, Colford JM Jr. Interferon-γ assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2004; 4:761-76
- (5) Aagaard C, Brock I, Olsen A, et al. Mapping immune reactivity towards Rv2653 and Rv2654: two novel low-molecular-mass antigens found specifically in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Infect Dis.* 2004;189: 812-819.
- (6) World Health Organization. Global tuberculosis report 2012. Genève: WHO, 2012 [consul. 18-4-2013]. Disponível em http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf
- (7) Direção Geral de Saúde. Circular Informativa nº04/PNT de 11/02/2010 [Em linha]. <http://www.gnovee.net/content/guidelines/Portugal%20TB%20Testing%20Guidance%20Document%2011-FEB-2010.pdf> [consul. 18-4-2013].
- (8) Direção Geral de Saúde. Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose. Ponto da Situação Epidemiológica e de Desempenho [Em linha]. Lisboa: DGS, 2012 [consul. 18-4-2013]. Disponível em: http://www.portaldasauade.pt/NR/rdonlyres/8E0DFF04-F030-43B4-80EB-A71AD96F3718/0/relatorio_tuberculose_2012.pdf
- (9) Costa JT, Silva R, Sá R, et al. Comparação do teste de libertação do interferão gama e a prova da tuberculina no rastreio de profissionais de saúde. *Revista Portuguesa de Pneumologia.* 2010;16: 211-221.
- (10) Costa JT, Sá R, Cardoso MJ, et al. Tuberculosis screening in Portuguese healthcare workers using the tuberculin skin test and the interferon-γ release assay. *Eur Respir J.* 2009;34: 1423-1428.

Gráfico 2: Resultado do rastreio de TB latente.



Perfil de suscetibilidade do vírus influenza aos antivirais específicos para a gripe de 2004 a 2011

Vanessa Correia, Luís André Santos, Helena Rebelo de Andrade
h.rebelo.andrade@insa.min-saude.pt

Unidade de Investigação e Desenvolvimento.
Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

A emergência de resistências aos antimicrobianos constitui uma das grandes preocupações de saúde pública, sendo considerada sempre que um novo medicamento é licenciado para uso clínico⁽¹⁾. No caso dos antivirais específicos para a gripe, a resistência pode emergir não apenas como resultado do tratamento ou profilaxia com o medicamento antiviral mas também espontaneamente na comunidade⁽²⁾. A possibilidade de emergência de estirpes de vírus influenza naturalmente resistentes, conjugada com a elevada e rápida taxa de evolução que caracteriza estes vírus, impõe uma observação ativa e sustentada do perfil de suscetibilidade aos antivirais dos vírus influenza que circulam na população. A realização destas atividades de observação, individualmente em cada país, contribui e é fundamental para a representatividade e robustez dos dados analisados e reportados pelos sistemas de vigilância europeu (ECDC) e mundial (OMS), nos quais se baseiam as recomendações para o uso destes antivirais na prática clínica.

Em 2007 começou a ser desenvolvido pela primeira vez em Portugal um estudo na área da resistência aos antivirais específicos para a gripe, com o principal objetivo de avaliar a suscetibilidade dos vírus influenza circulantes (retrospectivamente desde o Inverno 2004/2005) aos três antivirais autorizados para uso clínico a nível nacional: oseltamivir e zanamivir (inibidores da neuraminidase, NAI) e amantadina (inibidor da proteína M2). Neste trabalho são apresentados de forma resumida os principais resultados e conclusões deste estudo, abrangendo 7 épocas de Inverno, de 2004/2005 a 2010/2011, descritos com maior detalhe em outras publicações da equipa de investigação^(3,4,5).

A avaliação laboratorial da suscetibilidade aos NAIs inclui uma componente fenotípica (valor de IC₅₀) e uma componente genotípica (sequenciação da região codificante completa da neuraminidase, NA, e da hemaglutinina, HA). No total, foi avaliado o perfil fenotípico de 482 estirpes para o oseltamivir (117 A(H3N2), 93 A(H1N1) sazonal, 130 B, 142 A(H1N1)pdm09) e de 439 estirpes para o zanamivir (112 A(H3N2), 68 A(H1N1) sazonal, 117 B, 142 A(H1N1)pdm09). Destas, 186 estirpes (50 A(H3N2), 61 A(H1N1) sazonal, 25 B,

50 A(H1N1)pdm09) foram analisadas genotipicamente. A avaliação da suscetibilidade à amantadina é definida genotipicamente (sequenciação do segmento da proteína M2 que inclui os 5 marcadores moleculares de resistência: L26F; V27A/D; A30T; S31N e G34E), tendo sido realizada num total de 322 estirpes (138 A(H3N2), 84 A(H1N1) sazonal, 117 A(H1N1)pdm09).

Inibidores da Neuraminidase (NAIs) – oseltamivir e zanamivir

Foram detetadas 27 (29%, N=93) estirpes do subtipo A(H1N1) sazonal naturalmente resistentes ao oseltamivir, entre os Invernos 2007/2008 a 2008/2009, com base na extrema redução de suscetibilidade observada a nível fenotípico (170 a 650 vezes) e na presença do marcador genético de resistência clínica H275Y na sequência da NA (Gráfico 1 O). Este resultado está de acordo com a emergência e transmissão global de estirpes A(H1N1) sazonal resistentes ao oseltamivir, detetada a partir de 2007/2008 e cuja razão ainda não se encontra completamente esclarecida⁽⁶⁾. As mesmas condições de resistência foram observadas em 1 estirpe da variante pandémica com associação ao uso do antiviral num caso de suspeita de resistência clínica (Gráfico 1 O). O marcador NA H275Y foi também identificado, mas em 26,2% da população viral, noutro caso de infeção por A(H1N1)pdm09 com suspeita de resistência clínica. Foram ainda detetadas 3 estirpes com suscetibilidade reduzida a ambos os NAIs (oseltamivir e zanamivir), 1 estirpe de vírus influenza do tipo B de 2007/2008 e 2 estirpes da variante A(H1N1)pdm09 do período pandémico. Estas estirpes apresentaram um valor de IC₅₀ 2 a 4 vezes superior à linha base e mutações na sequência da NA (NA D197N – B; NA I223V – A(H1N1)pdm09) já associadas a uma redução na suscetibilidade, embora com impacto clínico desconhecido (Gráfico 1 O e Gráfico 1 Z)⁽⁷⁾. A mutação NA N220K, localizada no domínio catalítico da proteína, foi selecionada para estudos posteriores, dada a sua presença específica em 3 estirpes de vírus influenza do tipo B com valores de IC₅₀ 2 vezes superiores à linha base de suscetibilidade para o oseltamivir.

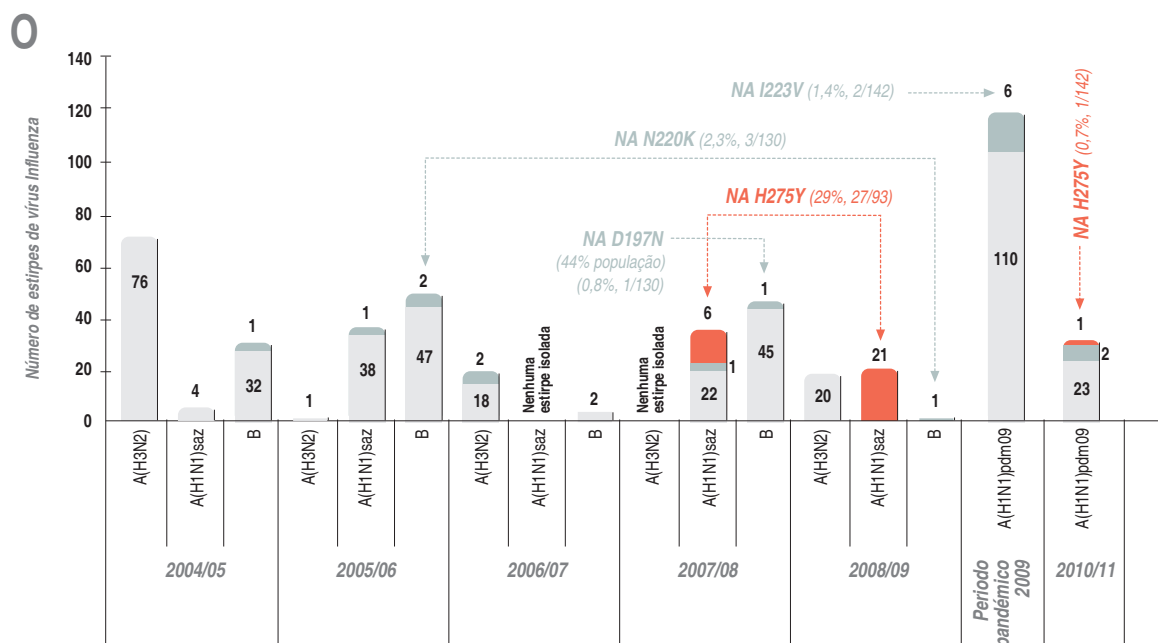
Amantadina

A resistência à amantadina foi observada em 49 estirpes A(H3N2) (35,5%, N=138) dos Invernos de 2005/2006 a 2008/2009 e em todas as estirpes A(H1N1)pdm09 analisadas, através da identificação do marcador de resistência S31N na sequência da proteína M2. Estes resultados encontram-se em conformidade com a situação observada a nível mundial. Desde o Inverno 2002/2003 que o número de estirpes A(H3N2) resistentes à amantadina isoladas a nível mundial foi aumentando exponencialmente, atingindo praticamente os 100% em 2008/2009. A combinação de um uso elevado deste medicamento antiviral no Sudeste Asiático com a ocorrência de mutações compensatórias no genoma do vírus é considerada como a causa mais provável para o aumento abrupto no número de estirpes resistentes⁽⁸⁾. A variante A(H1N1)pdm09 é caracterizada desde a sua emergência por uma resistência natural à amantadina, adquirida como resultado da origem suína Euroasiática do gene M que codifica para a proteína M2.

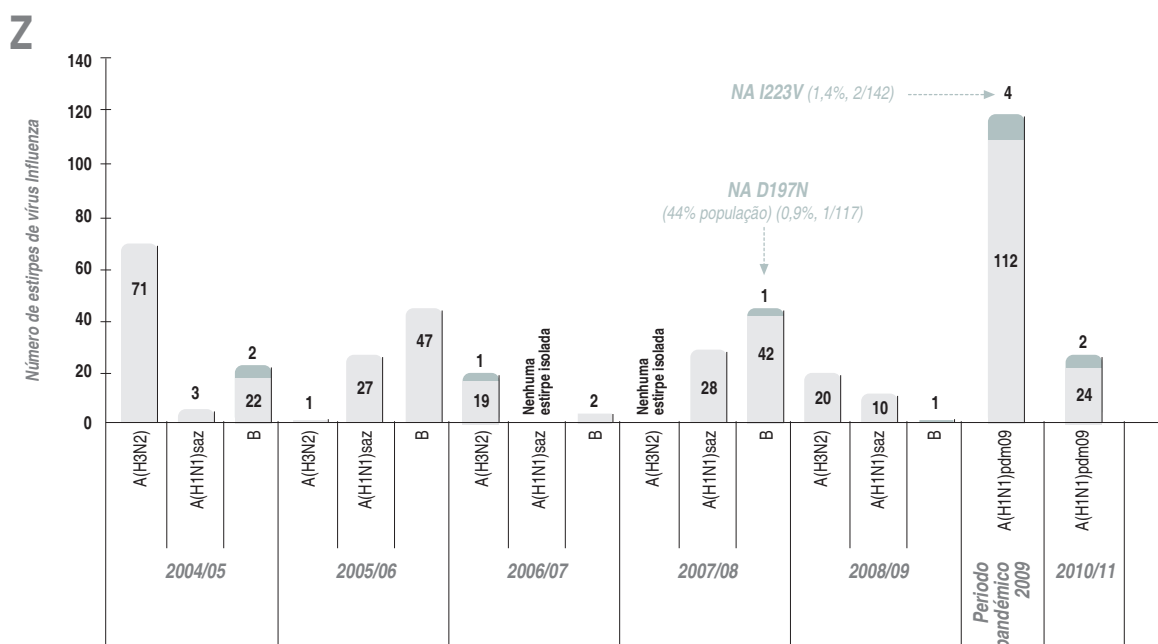
→ continua

artigos breves_ n. 5

Gráfico 1 : Perfil fenotípico de suscetibilidade ao oseltamivir (O) e ao zanamivir (Z) de estirpes de vírus influenza que circularam em Portugal entre os Invernos 2004/2005 a 2010/2011, apresentado por (sub)tipo/variente e época de Inverno e com indicação das mutações específicas e relevantes identificadas a nível genotípico.



(Sub) Tipo ou variante de vírus Influenza / Época de Inverno



(Sub) Tipo ou variante de vírus Influenza / Época de Inverno

■ Suscetível - Inibição Normal (redução <10x linha de base - Influenza A; redução <5x linha de base - Influenza B)
 ■ Inibição normal mas outlier estatístico
 ■ Inibição Reduzida (redução entre 10 - 100x linha de base - Influenza A; redução 5 - 50x linha de base - Influenza B)
 ■ Inibição Extremamente Reduzida (redução >100x linha de base - Influenza A; redução >50x linha de base - Influenza B)

→ continua

artigos breves_ n. 5

Este estudo permitiu conhecer o perfil de suscetibilidade das estirpes de vírus influenza que circulam em Portugal aos medicamentos antivirais oseltamivir, zanamivir e amantadina; observar e conhecer o padrão de variação natural da suscetibilidade dos vírus ao longo dos diferentes Invernos, de acordo com o (sub)tipo/variante; detetar casos de emergência natural de estirpes resistentes; e analisar e estudar casos com suspeita de resistência clínica. Permitiu igualmente contribuir de modo ativo para as recomendações e orientações técnicas elaboradas pelos grupos europeu do ECDC e mundial da OMS (9,10).

Referências bibliográficas:

- (1) Zambon M, Hayden FG. Position statement: global neuraminidase inhibitor susceptibility network. *Antiviral Res.* 2001; 49(3):147-56. Review.
- (2) Hayden FG, de Jong MD. Emerging influenza antiviral resistance threats. *J Infect Dis.* 2011; 203(1):6-10.
- (3) Correia V, Rebelo de Andrade H, Santos LA, et al. Antiviral drug profile of seasonal influenza viruses circulating in Portugal from 2004/2005 to 2008/2009 winter seasons. *Antivir Res.* 2010; 86(2010): 128-136.
- (4) Santos LA, Correia V, Gíria M, et al. Genetic and Antiviral Drug Susceptibility Profiles of Pandemic A(H1N1)v Influenza Virus Circulating in Portugal. *Influenza Other Respi Viruses.* 2011; 5 (Suppl. 1): 294-300.
- (5) Gíria MT, Rebelo de Andrade H, Santos LA, et al. Genomic signatures and antiviral drug susceptibility profile of A(H1N1)pdm09. *J Clin Virol.* 2012; 53(2):140-144.
- (6) Renaud C, Kuypers J, Englund JA. Emerging oseltamivir resistance in seasonal and pandemic influenza A/H1N1. *J Clin Virol.* 2011; 52(2):70-78.
- (7) Nguyen HT, Fry AM, Gubareva LV. Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses and laboratory testing methods. *Antivir Ther.* 2012; 17(1 Pt B):159-73.
- (8) Deyde VM, Xu X, Bright RA, et al. Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A(H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide. *J Infect Dis.* 2007; 196:249-257.
- (9) Pozo F, Lina B, Andrade HR, et al. Guidance for clinical and public health laboratories testing for influenza virus antiviral drug susceptibility in Europe. *J Clin Virol.* 2013; doi:pii: S1386-6532(13)00033-4.10.1016/j.jcv.2013.01.009.
- (10) World Health Organization. Meetings of the WHO working group on surveillance of influenza antiviral susceptibility – Geneva, November 2011 and June 2012. *Wkly Epidemiol Rec.* 2012; 87(39):369-374.

artigos breves_ n. 6

Infeções Gastrointestinais

Infeções por *Salmonella enterica* no período entre 2000-2012

Leonor Silveira, Adelaide Marques, Jorge Machado

jorge.machado@insa.min-saude.pt

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

Introdução

Salmonella enterica é uma das causas mais comuns de gastroenterite aguda em todo o mundo, apresentando elevada morbilidade e mortalidade na população em geral ⁽¹⁾. A infeção por *Salmonella* é caracterizada clinicamente pela presença de febre, dor abdominal e náusea, sendo de maneira geral de curta duração. No entanto podem ocorrer casos mais graves, nomeadamente em indivíduos imunocomprometidos, em que é necessária a administração de antibióticos ⁽²⁾. A sua transmissão ocorre principalmente através da alimentação, com a exceção de *Salmonella Typhi*, serotipo com hospedeiro exclusivamente humano ⁽³⁾.

Métodos

Entre 2000 e 2012 foram recebidas no Laboratório Nacional de Referência de Infeções Gastrointestinais do Departamento de Doenças Infecciosas do INSA 6366 estirpes de *Salmonella* de doentes portugueses, provenientes de várias zonas do país. Os serotipos foram determinados de acordo com o esquema de classificação Kauffmann-White-de Minor, segundo a ISO/TR 6579-3 ^(4, 5).

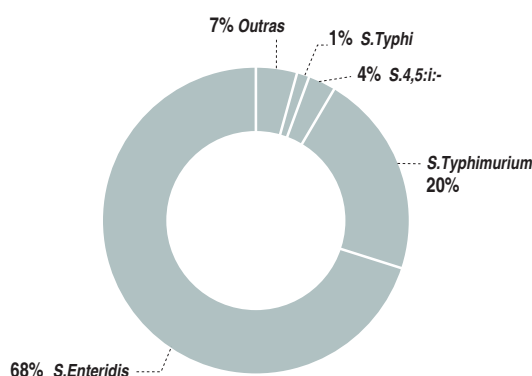
Resultados e Discussão

No período compreendido entre 2000 e 2012 foram analisadas, como já foi referido, 6366 estirpes de *Salmonella*, sendo os serotipos mais comuns, tal como na maior parte dos países europeus e norte americanos, *S. Enteritidis* (68,0%), *S. Typhimurium* (19,5%) e *S. 4,5:i:-* (4,5%) **(Tabela 1, Gráfico 1)**. Existem também outros serotipos detetados cuja frequência não é tão significativa mas cujos valores se aproximam das frequências a nível mundial, nomeadamente *S. Typhi* (0,6%) e *S. Derby* (0,5%). Com uma frequência bastante próxima destes dois serotipos, situa-se *S. Rissen* (0,5%), tipicamente encontrada na Tailândia e nas Filipinas, sendo então possível que a sua presença em Portugal se deva a casos de importação, à semelhança dos casos de *S. Typhi* ⁽⁶⁾. Existem ainda muitos outros serotipos detetados em Portugal, cuja frequência não é significativa isoladamente, mas que em conjunto representam cerca de 7% das estirpes analisadas **(Gráfico 1)**.

Tabela 1: Número de casos de infeção por *Salmonella* confirmados, principais serotipos detetados e percentagens relativas, durante o período compreendido entre 2000 e 2012.

	2000		2001		2002		2003		2004		2005		2006		2007		2008		2009		2010		2011		2012		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
S.Enteritidis	258	68,8	441	75,9	424	77,2	580	80,1	555	80,3	556	70,7	423	67,8	466	70,7	309	60,7	159	46,1	78	32,6	34	22,6	43	27,6	4326	68,0
S.Typhimurium	70	18,7	66	11,4	86	15,7	98	13,5	90	13,0	175	22,3	151	24,2	129	19,6	126	24,8	95	27,5	83	34,7	44	34,4	30	19,2	1243	19,5
S.4,5:i:-	0	0,0	24	4,1	6	1,1	0	0,0	7	1,0	15	1,9	12	1,9	17	2,6	29	5,7	43	12,5	54	22,6	24	18,8	55	35,3	286	4,5
S.Typhi	2	0,5	3	0,5	11	2,0	2	0,3	4	0,6	3	0,4	3	0,5	2	0,3	5	1,0	0	0,0	1	0,4	1	0,8	1	0,6	38	0,6
S.Derby	2	0,5	4	0,7	2	0,4	1	0,1	3	0,4	5	0,6	0	0,0	3	0,5	2	0,4	3	0,9	3	1,3	1	0,8	3	1,9	32	0,5
S.Rissen	1	0,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	0,3	4	0,5	3	0,5	0	0,0	4	0,8	9	2,6	1	0,4	2	1,6	5	3,2	31	0,5
Outros	42	11,2	43	7,4	20	3,6	43	5,9	30	4,3	28	3,6	32	5,1	42	6,4	34	6,7	36	10,4	19	7,9	22	17,2	19	12,2	410	6,4
Total (N)	375	100	581	100	549	100	724	100	691	100	786	100	624	100	659	100	509	100	345	100	239	100	128	100	156	100	6366	100

Gráfico 1: Percentagem total dos principais serotipos de *Salmonella* detetados.



→ continua

artigos breves_ n. 6

_A partir de 2005, verificou-se uma diminuição acentuada do número de S. Enteritidis, com a consequente diminuição do número total de estirpes de *Salmonella* (Gráfico 2). Este serotipo está normalmente associado ao consumo de ovos e carne de aves, pelo que a sua diminuição, e a diminuição do número total de *Salmonella*, estarão relacionadas com o maior controlo sanitário a nível dos aviários e também das cadeias de produção (2).

_O serotipo S. Typhimurium está usualmente associado a carne de origem suína, ou nalguns casos, a carne de aves ou água contaminada (7). Apesar de também se verificar a diminuição do número total de S. Typhimurium, a sua percentagem relativa tem vindo a incrementar, ultrapassando inclusivamente a percentagem de S. Enteritidis durante

os anos de 2010 e 2011 (Gráficos 2 e 3). Desde o fim da década de 90 tem-se verificado o aumento gradual de infeções causadas por uma estirpe de *Salmonella* do mesmo grupo clonal de S. Typhimurium, mas que não apresenta antígenos da segunda fase flagelar, S. 4,5:i:-. Em 2012, detetou-se efetivamente um maior número de S. 4,5:i:- do que de S. Typhimurium, que levou à diminuição da percentagem relativa de S. Typhimurium (Gráficos 2 e 3). Este aumento é uma tendência a nível mundial e um problema de saúde pública, uma vez que este serotipo apresenta perfis de resistência a antibióticos frequentemente utilizados em produção animal (7, 8). Relativamente ao serotipo S. Typhi, o seu número tem-se mantido constante, apresentando uma média de 0,75 nos últimos 4 anos, corroborando com o facto de se tratar de casos importados.

Gráfico 2 : Casos confirmados dos principais serotipos de *Salmonella*, durante o período compreendido entre 2000 e 2012.

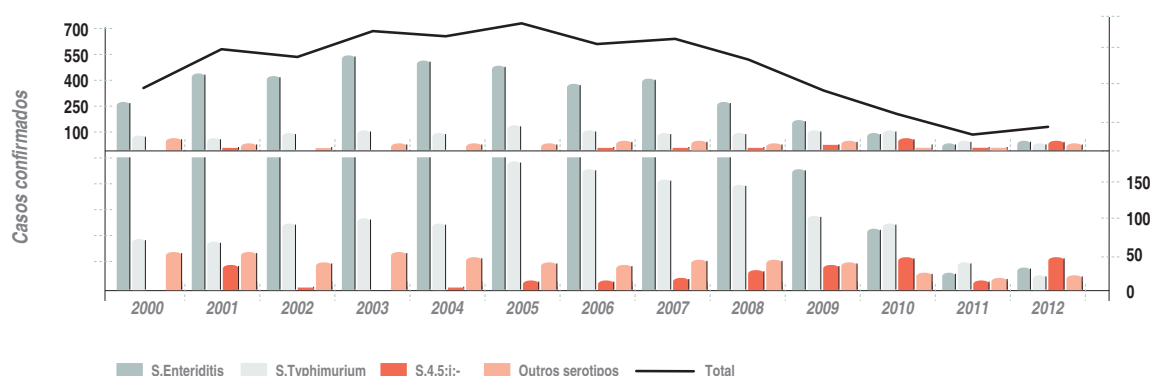
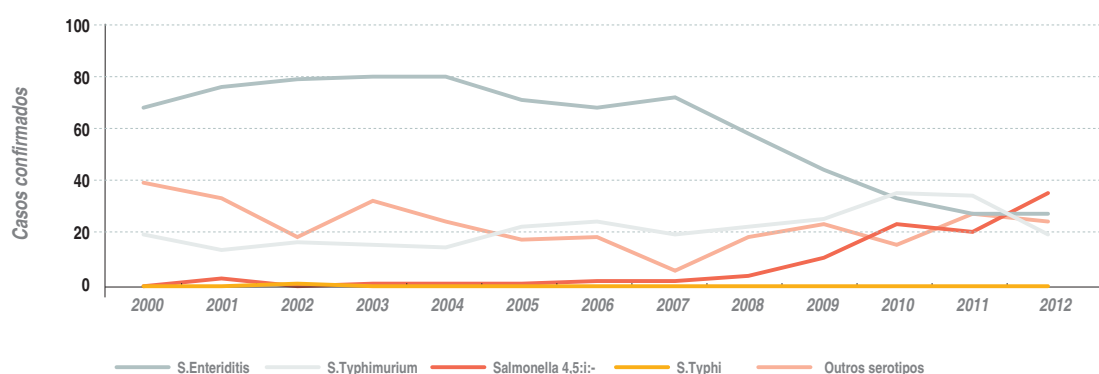


Gráfico 3 : Percentagem de casos confirmados dos principais serotipos de *Salmonella*, durante o período compreendido entre 2000 e 2012.



artigos breves_ n. 6

As alterações a nível dos serotipos de *Salmonella* presentes em Portugal são significativas e acompanham a tendência mundial, reforçando o facto de ser necessária atuação relativamente ao serotipo S. 4,5:i:- e também ao controlo do uso de antibióticos na produção animal. A existência de sistemas de vigilância é de extrema importância pois permite a monitorização dos serotipos de *Salmonella* presentes no país e qual a sua proveniência. Assim, é possível tomar medidas preventivas, tais como as medidas tomadas a nível de controlo sanitário nos aviários, que levam à diminuição de infeções por *Salmonella*, e que deverão ser aplicadas a outros tipos de produção, nomeadamente à produção de suínos.

Referências bibliográficas:

- (1) Majowicz SE, Musto J, Scallan E, et al. The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases* 2010; 50:882–889.
- (2) European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *EFSA Journal* 2011; 9(3):2090.
- (3) Herikstad H, Motarjemi Y, Tauxe RV. *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. *Epidemiology & Infection* 2002; 129: 1-8.
- (4) WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*; Grimont PAD, Weill FX. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9th ed. Paris: WHO/Institut Pasteur, 2007.
- (5) ISO/TR 6579-3, Microbiology of food and animal feed – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 3 Guidelines for serotyping of *Salmonella* spp. Hendriksen RS, Vieira AR, Karlsmose S, et al. Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathog Dis.* 2011;8(8):887-900.
- (6) EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on monitoring and assessment of the public health risk of “*Salmonella* Typhimurium-like” strains. *EFSA Journal* 2010;8(10):1826.
- (7) Mourão J, Dias L, Ferreira L, et al. *Salmonella enterica* serotipo 4,[5],12:i:-, um perigo emergente de segurança alimentar. P3 - 4ª Reunião Anual PortFIR 2011.

artigos breves_ n. 7

Infeções Gastrointestinais

A infeção humana por *Campylobacter* em Portugal: alguns dados epidemiológicos

Andreia Duarte^{1,2}, Andreia Santos¹, João Benoliel¹,
Fernanda Domingues², Mónica Oleastro¹.

monica.oleastro@insa.min-saude.pt

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

(2) Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS-UBI),
Universidade da Beira Interior.

Introdução

A infeção por *Campylobacter* spp., sobretudo por *Campylobacter jejuni*, é considerada, nos países industrializados, a causa mais frequente de gastroenterite aguda nos humanos, excedendo mesmo as infeções causadas por espécies de *Salmonella*, *Shigella* ou *Escherichia coli* enteropatogénica. Outro dado importante é a tendência crescente desta infeção, verificada nos últimos anos na Europa, comparativamente com os casos de Salmonelose que têm vindo a decrescer, segundo um relatório que incluiu dados de 24 estados membros, no período entre 2006 e 2010⁽¹⁾.

O quadro clínico associado à infeção por *Campylobacter* traduz-se maioritariamente por diarreias inflamatórias acompanhadas de febre e dores abdominais. Apesar de na maioria dos casos ser uma infeção auto-limitada, podem surgir graves complicações como septicémias, infeções extraintestinais e sequelas neurológicas, como a síndrome de Guillain-Barré⁽²⁾. Está bem estabelecido que a principal fonte de infeção é o consumo ou manipulação de alimentos contaminados, sobretudo carne de aves⁽³⁾.

Em Portugal, os estudos sobre a prevalência desta doença são escassos e de carácter muito regional, sendo o panorama nacional desconhecido. A partir de 2009 foi constituído um grupo de trabalho nacional^(*), coordenado pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), para o estudo da *Campylobacter* humana, que conta atualmente com a participação ativa de 17 laboratórios, maioritariamente laboratórios hospitalares, com uma considerável cobertura geográfica. Cada laboratório, que realiza sistematicamente a

pesquisa de *Campylobacter* em amostras fecais, envia para o INSA parte das estirpes isoladas, juntamente com alguma informação epidemiológica, permitindo assim fazer a caracterização das mesmas, incluindo vigilância da resistência aos antibióticos.

Neste trabalho, são divulgados alguns dados referentes à epidemiologia da infeção por *Campylobacter* em Portugal, tendo como base as estirpes clínicas obtidas através deste grupo de trabalho.

Métodos

As estirpes clínicas foram identificadas ao nível da espécie por PCR em Tempo-real com sondas de hibridação. Nos casos onde não foi possível obter identificação, foi realizado um PCR para o gene que codifica o 16S rRNA, seguido de sequenciação.

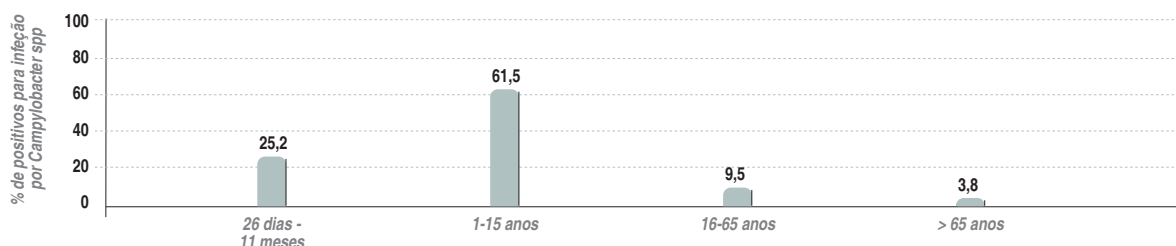
A concentração mínima inibitória (CMI) de sete antibióticos (ácido nalidíxico, amoxicilina, ciprofloxacina, doxiciclina, eritromicina, gentamicina e tetraciclina) foi determinada pelo método de diluição em agar, segundo as recomendações padrão. A suscetibilidade antimicrobiana foi interpretada de acordo com os valores epidemiológicos estabelecidos pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2012). As estirpes foram genotipadas por *Multi Locus Sequencing Typing* (MLST), por amplificação por PCR de sete genes *housekeeping* (*aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt* e *uncA*)⁽⁴⁾. Os produtos de PCR foram purificados e sequenciados e os tipos de sequências e complexos clonais foram identificados utilizando o banco de MLST para *Campylobacter* (<http://pubmlst.org/campylobacter>).

Resultados

Entre 2009 e 2012, foram analisadas 837 estirpes, das quais 84,5% foram identificadas como *C. jejuni*, 14,8% *C. coli*, 0,2% *C. upsaliensis*, 0,1% *C. concisus*, e em 0,2% das amostras foi identificado *Arcobacter butzleri*.

A distribuição das estirpes por grupo etário foi a seguinte: idade entre 26 dias e 11 meses, 208 (25,2%); entre 1 e 15 anos, 507 (61,5%); entre 16-65 anos, 78 (9,5%); idade >65 anos, 31 (3,8%), sendo a infeção mais frequente no género masculino (59,3%) (Gráfico 1).

Gráfico 1: Distribuição das estirpes de *Campylobacter* spp por grupo etário.



→ continua

artigos breves_ n. 7

Em relação à resistência aos antibióticos e tipagem molecular, foram estudadas um total de 125 estirpes, 78 *C. jejuni* e 47 *C. coli*. No geral, foi observada uma elevada taxa de estirpes resistentes (Tabela 1), sendo as estirpes de *C. coli* mais resistentes do que as estirpes de *C. jejuni*. Todas as estirpes foram resistentes ao ácido nalidíxico, 92,8% foram resistentes às fluoroquinolonas e 76% resistentes à tetraciclina/doxiciclina. De realçar ainda a elevada prevalência de estirpes multirresistentes (resistentes a pelo menos 3 antibióticos estruturalmente não relacionados), que foi de 87,2%, bem como o aparecimento de 2 (1,6%) estirpes *C. coli* resistentes à gentamicina.

Comparando o período do presente estudo (2009-12) e o período entre 1984-89, para os quais existe informação disponível para *Campylobacter* de origem humana em Portugal, observa-se um considerável aumento de estirpes resistentes aos antibióticos (5) (Gráfico 2).

Em relação à genotipagem por MLST, cada estirpe é caracterizada por uma sequência tipo, que resulta do conjunto dos alelos obtidos para os sete genes *housekeeping*. As estirpes que partilham pelo menos quatro de sete alelos idênticos são consideradas mais próximas, e como pertencendo ao mesmo complexo clonal (CC). No geral, observou-se que as estirpes de *C. coli* são mais conservadas, pertencendo todas ao CC-828, enquanto os isolados *C. jejuni* foram distribuídos em 15 CCs diferentes. Entre as estirpes estudadas, foram identificadas 19 sequências tipo, ainda sem designação na base internacional de MLST para *Campylobacter*. Aparentemente, não foi observada nenhuma relação entre o fenótipo de resistência e o genótipo das estirpes.

Tabela 1: Resistência a diversos antibióticos de estirpes de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* de origem humana, isoladas em Portugal, entre 2009-2012.

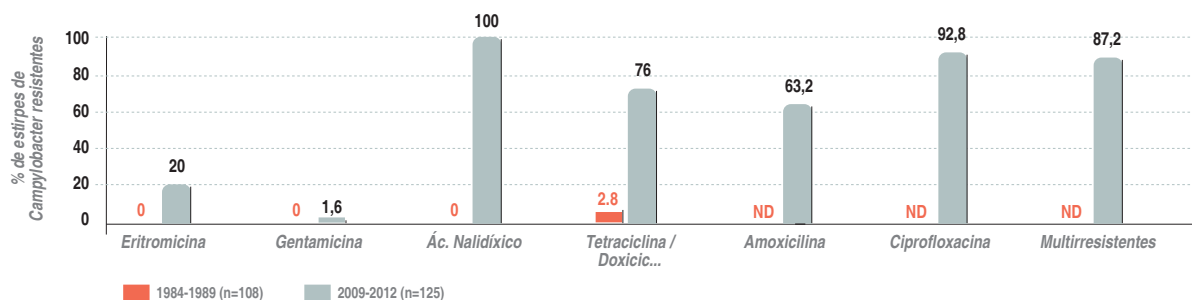
Antibióticos	Intervalo CMI ^a	<i>Campylobacter jejuni</i> (n=78)			<i>Campylobacter coli</i> (n=47)		
		CMI ₅₀ ^b	CMI ₉₀ ^c	Resistência % (n)	CMI ₅₀ ^b	CMI ₉₀ ^c	Resistência % (n)
Ác. Nalidíxico	2 – 32	>32	>32	100 (78)	>32	>32	100 (47)
Amoxicilina	2 – 32	32	>32	57,7 (45)	32	>32	72,3 (34)
Ciprofloxacina	0,25 – 4	>4	>4	91 (71)	>4	>4	95,7 (45)
Doxiciclina/Tetraciclina	0,125 – 2	2	>2	65,4 (51)	>2	>2	93,6 (44)
Eritromicina	1 – 16	<ou=1	4	9 (7)	4	>16	38,3 (18)
Gentamicina	0,25 – 4	<ou=0,25	0,5	0 (0)	<ou=0,25	0,5	4,3 (2)

CMI – concentração mínima inibitória

^a Intervalo de concentrações testadas (µg/mL)

^{b,c} CMI₅₀ e CMI₉₀ indica a concentração (µg/mL) que inibe o crescimento de 50% e 90% dos isolados.

Gráfico 2: Taxas de resistência a diversos antibióticos de estirpes de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* de origem humana, isoladas em Portugal, em dois períodos de tempo distintos, 1984-1989 (5) e 2009-2012.



artigos breves_ n. 7

Discussão

A análise das características epidemiológicas da infeção por *Campylobacter* em Portugal mostra que a principal espécie que infeta o homem é *C. jejuni*, tal como descrito noutros estudos, apesar de a prevalência de *C. coli* observada ser superior ao que é reportado para os países ocidentais (6). Como era esperado, o grupo etário de maior risco foram as crianças com idade >1 ano, sendo no entanto de sublinhar a elevada taxa de infeção mesmo nos recém-nascidos e bebés (25,2%).

Em relação às antibioresistências, foram muito altas, incluindo aos macrólidos e fluoroquinolonas, que são os antibióticos mais frequentemente utilizados para tratar a infeção por *Campylobacter* mais prolongada ou severa. Além disso, observa-se uma tendência crescente de estirpes resistentes, p.ex. para a ciprofloxacina, se comparadas com as taxas descritas noutros trabalhos realizados anteriormente a 2009 (5,7), e a emergência de estirpes resistentes a outros grupos de antibióticos, como os aminoglicosídeos. As taxas de antibioresistência encontradas estão em consonância com as descritas para estirpes de *Campylobacter* de origem animal, refletindo a utilização destes antibióticos na produção animal que se destina ao consumo humano (8).

Em conclusão, estes dados mostram a importância da infeção por *Campylobacter* em Portugal e reforçam a necessidade de se manter uma vigilância epidemiológica desta infeção, já que a emergência de estirpes multirresistentes sugere um aumento do seu potencial zoonótico.

Referências bibliográficas:

- (1) European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. EFSA J. 2012;10:2597.
- (2) Yuki N, Susuki K, Koga M, et al. Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide causes Guillain-Barre syndrome. PNAS USA. 2004;101:11404-9.
- (3) Silva J, Leite D, Fernandes M, et al. *Campylobacter* spp. as a Foodborne Pathogen: a review. Front Microbiol. 2011;2:200.
- (4) Dingle KE, Colles FM, Wareing DR, et al. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol. 2001;39, 14-23.
- (5) Cabrita J, Pires I, Vlaes L, et al. *Campylobacter* enteritis in Portugal: epidemiological features and biological markers. Eur J Epidemiol. 1992;8(1):22-6.
- (6) Gallay A, Prouzet-Mauléon V, Kempf I, et al. *Campylobacter* antimicrobial drug resistance among humans, broiler chickens, and pigs, France. Emerg Infect Dis 2007;13(2):259-66.
- (7) Vicente A, Barros R, Florinda A, et al. High rates of fluoroquinolone resistant *Campylobacter* in Portugal: need for surveillance. Euro Surveill. 2008;13(6):pii=8031.
- (8) Carreira AC, Clemente L, Rocha T, et al. Comparative genotypic and antimicrobial susceptibility analysis of zoonotic *Campylobacter* species isolated from broilers in a nationwide survey, Portugal. J Food Prot. 2012;75(12):2100-9.

(*) Laboratórios que integram o grupo de trabalho para o estudo da Campylobacteriose:

Centro Hospitalar Barreiro-Montijo, EPE
Centro Hospitalar Cova da Beira, EPE
Centro Hospitalar de Coimbra, EPE
Centro Hospitalar de Lisboa Central, EPE
Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro, EPE
Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho, EPE
Centro Hospitalar do Tâmega e Sousa, EPE
Centro Hospitalar entre Douro e Vouga, EPE
Centro Hospitalar Oeste Norte, EPE
Centro Hospitalar Póvoa Varzim/Vila Conde, EPE
Hospital Cascais Dr. José de Almeida, HPP
Hospital de Braga
Hospital de São João
Hospital Garcia de Orta
Laboratório de Análises Clínicas Santos Monteiro
Unidade Laboratorial Integrada de Microbiologia do INSA, IP
Unidade Local de Saúde de Matosinhos

artigos breves_ n. 8

Infeções Gastrointestinais

Patotipos de *Escherichia coli* associados a infeções entéricas entre 2002-2012

Leonor Silveira, Adelaide Marques, Jorge Machado
jorge.machado@insa.min-saude.pt

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

Introdução

Escherichia coli (*E. coli*) é uma bactéria comensal que coloniza o sistema gastrointestinal, mais especificamente, a mucosa do cólon. Contudo, existem estirpes que adquiriram fatores de virulência que permitem a infeção de indivíduos saudáveis. Estão descritos seis patotipos intestinais de *E. coli*: *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica ou produtora de verotoxinas (EHEC ou VTEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* de difusão aderente (DAEC) (1). De maneira geral, estes patotipos causam dores abdominais e diarreia, por vezes hemorrágica, sendo também possível a ocorrência de febre e vómitos. A sua transmissão é feita através do consumo de água ou alimentos contaminados, ou através do contacto com animais ou pessoas infetados (2).

A distinção entre estirpes de *E. coli* patogénicas e comensais não é possível através de isolamento em placa ou de testes bioquímicos, sendo necessárias identificar os fatores determinantes das estirpes patogénicas. São várias as características que conferem patogenicidade à *E. coli*, desde a produção de toxinas, à presença de proteínas envolvidas na colonização e invasão celular, podendo esses fatores de patogenicidade detetados por PCR (2).

Métodos

Entre 2002 e 2012 foram recebidas no Laboratório Nacional de Referência de Infeções Gastrointestinais do Departamento de Doenças Infecciosas do INSA, 1038 estirpes de *E. coli* de doentes portugueses de diversas regiões do país. Foram determinados, por PCR convencional, os principais fatores de patogenicidade, a referir: as toxinas termo estável (ST) e termolábil (LT), a verotoxina (VT), a toxina enteroagregativa termo estável (EAST) e a intimina (Quadro 1).

Resultados e Discussão

Das 1038 amostras analisadas, 497 apresentaram resultados positivos relativamente à presença de um ou mais fatores de patogenicidade (Tabela 1). O patotipo detetado com maior frequência durante este período foi ETEC (36,6%), e EAEC (26,7%) e VTEC (25,3%). Com uma frequência bastante mais baixa encontra-se o patotipo EPEC (8,5%) e, com uma frequência de 2,9%, os casos em que os fatores de patogenicidade dos patotipos ETEC/VTEC foram detetados em simultâneo (Gráfico 1, Tabela 1).

Esta grande diversidade de patotipos deve-se essencialmente à grande plasticidade genómica de *E. coli*, resultante da codificação dos fatores de patogenicidade em elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposões, bacteriófagos, ilhas de patogenicidade, etc.) (2).

Inicialmente, nos anos 2002 e 2003, o patotipo mais comum era EAEC, seguido dos patotipos VTEC e ETEC. Essa tendência inverteu em 2004 e manteve-se até 2012 sendo o patotipo mais frequente ETEC, com exceção dos anos 2007 e 2008 (Gráfico 2 e 3). Este patotipo é uma das causas mais comuns de diarreia em crianças de países desenvolvidos, sendo também a principal causa da “diarreia do viajante” (2). O patotipo EAEC é também bastante comum, tanto em crianças como em adultos, sendo responsável por vários surtos em países em desenvolvimento e em países desenvolvidos (2). Já a elevada frequência de deteção do patotipo VTEC é justificável pela baixa dose infetante destas estirpes (2) e pelos casos mais graves que pode originar.

E. coli é um dos microrganismos mais versáteis que se conhece. A mutabilidade de *E. coli*, que lhe permite constante adaptabilidade ao meio, enaltece a importância de redes de vigilância que monitorizem e acompanhem estas alterações. A monitorização das estirpes de *E. coli* deve passar pela identificação dos principais fatores de patogenicidade, uma vez que são estes que determinam a patogenicidade das estirpes. No entanto, a serotipagem de *E. coli* está a ser efetuada, possibilitando uma análise mais profunda dos tipos de estirpes circulantes sendo assim possível a vigilância epidemiológica dos diferentes patotipos e um estudo mais aprofundado, ao nível molecular, da evolução destas estirpes em Portugal.

Quadro 1: Principais fatores de patogenicidade detetados e respetivos genes codificantes.

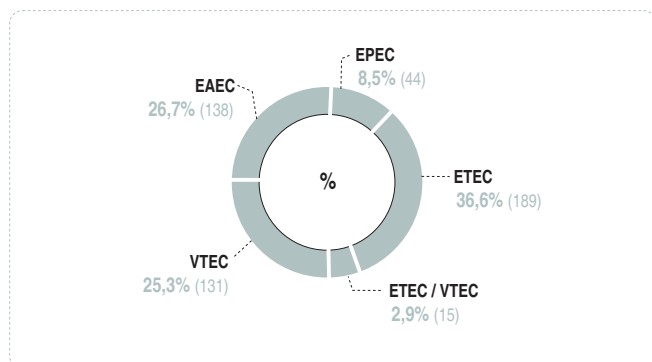
Fator de patogenicidade	Gene codificante
ST	<i>est</i>
LT	<i>elt</i>
VT	<i>stx</i>
EAST	<i>astA</i>
Intimina	<i>eae</i>

artigos breves_ n. 8

Tabela 1: Número de casos de infeção por *E.coli* confirmados, principais patotipos e fatores de patogenicidade detetados, durante o período compreendido entre 2002 e 2012.

Anos:		2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	Total	Total de cada patotipo
Patotipos	Genes	Número de resultados positivos												
ETEC	elt	0	2	9	16	11	11	17	14	5	1	4	90	183
	est	2	0	4	9	8	1	1	10	2	2	3	42	
	elt astA	1	2	2	2	2	0	6	2	1	1	1	20	
	est astA	0	0	6	0	2	0	0	0	0	0	0	8	
	elt est	1	1	5	0	1	0	1	0	0	1	0	10	
	elt eae	0	0	1	0	0	2	0	2	0	1	3	9	
	elt est astA	1	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4	
EPEC	eae	3	5	2	5	3	5	1	5	1	5	4	39	42
	eae astA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	3	
VTEC	stx	3	7	14	11	13	15	17	11	3	6	3	103	136
	stx eae	0	0	8	2	1	0	3	4	0	0	1	19	
	ste astA	1	3	3	1	1	3	0	0	0	0	0	12	
	stx astA eae	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
EAEC	astA	7	16	13	16	19	19	7	7	4	6	7	121	121
ETEC /VTEC	stx elt	0	1	0	1	0	3	1	1	0	0	0	7	15
	stx est	0	0	0	0	1	0	0	4	0	0	0	5	
	elt stx eae	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	est astA stx	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	
	stx eae est	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
Total positivos		21	40	67	64	62	59	54	61	16	24	29	497	497

Gráfico 1: Percentagem total dos vários patotipos de *Escherichia coli* detetados.



artigos breves_ n. 8

Gráfico 2 : Número de casos confirmados dos vários patótipos de *Escherichia coli*, durante o período compreendido entre 2002 e 2012.

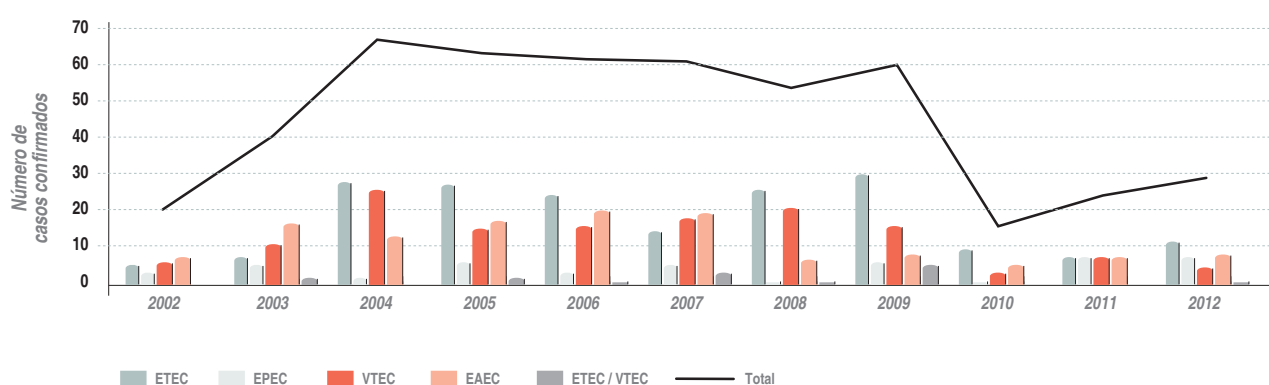
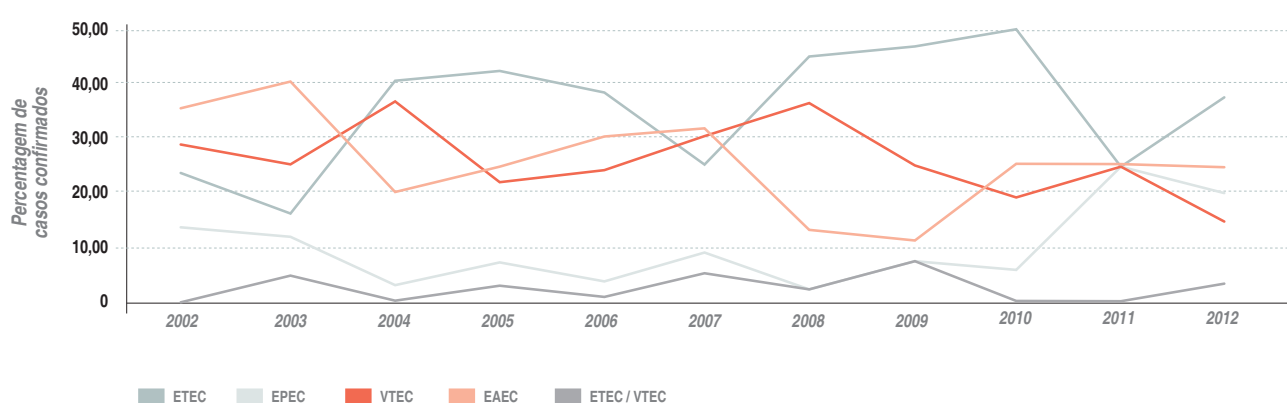


Gráfico 3 : Percentagem de casos confirmados dos vários patótipos de *Escherichia coli*, durante o período compreendido entre 2002 e 2012.



Referências bibliográficas:

- (1) Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Nat Rev Microbiol. 2004 Feb;2(2):123-40.
- (2) Centers for Disease Control and Prevention. E. coli (Escherichia coli). [Em linha]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html> [consult. 28-2-2013].

Frequência de infeção por *Giardia duodenalis* e fatores de risco associados na população pediátrica do distrito de Lisboa

Cláudia Júlio claudia.julio@insa.min-saude.pt

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

Introdução

Giardia duodenalis é um microrganismo eucariota unicelular flagelado. Sendo um dos protozoários parasitas mais comuns no intestino do homem, é o agente etiológico da giardíase ⁽¹⁾. A maioria das infeções são assintomáticas, podendo no entanto surgir sintomas como diarreia, dor abdominal, vómitos e perda de peso, sendo as crianças o principal grupo etário clinicamente afetado ⁽²⁾.

A prevalência de giardíase varia entre 2 e 5%, em países desenvolvidos e entre 20 e 30% nos países em desenvolvimento ⁽³⁾. Embora este parasita seja considerado comum em Portugal, a frequência desta infeção no grupo pediátrico português permanece desconhecida. O objetivo do presente trabalho foi estimar a frequência de infeção por *G. duodenalis* e identificar os possíveis fatores de risco numa população pediátrica residente no distrito de Lisboa.

Métodos

Entre fevereiro de 2002 e outubro de 2008, foram selecionadas aleatoriamente crianças em 25 centros de saúde das áreas urbana e rural do distrito de Lisboa, enquanto utentes do programa nacional de vacinação. Os pais das crianças deram consentimento informado por escrito, depois da explicação dos objetivos e procedimentos do estudo. Para cada criança participante, foi recolhida uma amostra de fezes. Foi igualmente preenchido um questionário incluindo informação sobre a criança e o seu agregado familiar e as condições de habitação incluindo informação sobre a presença de animais de companhia. As amostras recolhidas foram enviadas para o Departamento de Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. As fezes foram analisadas por exame microscópico direto e por pesquisa de antígeno pelo método imunoenzimático (ELISA). Os resultados foram analisados pelo teste de Fisher, e comparadas as diferenças entre duas proporções. Foi considerada significativa uma probabilidade inferior a 0,05. As variáveis foram calculadas e os Odds Ratios (OR) ajustados para níveis de significância e intervalos de confiança de 95%.

Resultados e Discussão

O estudo incluiu 844 crianças, sendo 446 (52,8%) do sexo masculino e 398 (47,2%) do sexo feminino, distribuídas por dois grupos etários, incluindo o primeiro as crianças de 1 mês aos 5 anos, num total de 403 (47,7%) crianças, e o segundo dos 6 aos 15 anos com 441 (52,3%) crianças.

Os resultados mostraram que 16 das 844 (1,9%), amostras de fezes foram positivas para *G. duodenalis* por exame direto, e 54 de 807 (6,7%) foram positivas por ELISA. Três amostras revelaram-se positivas por microscopia e negativas pelo método ELISA, por outro lado 42 amostras foram negativas por microscopia, mas positivas por ELISA. Assim na globalidade dos resultados verificamos que 58 das 844 amostras (6,9%) foram positivas para infeção por *G. duodenalis*. Quando analisamos os resultados por faixa etária e género verificamos que a frequência foi de 7,8% (31/396) nas crianças com idades entre 0 e 5 anos e 5,8% (25/439) nas crianças com idades compreendidas entre 6-15 anos; relativamente ao género, a frequência de infeção foi de 6,9% (31/447) nos rapazes e de 6,5% (26/397) nas raparigas. De entre os inúmeros putativos fatores de risco para a infeção por *G. duodenalis*, foi encontrada associação estatisticamente significativa com o nível educacional materno (OR=4,49; CI: 1,20-16,84), o nível educacional paterno (OR=12,26; CI: 4,08-36,82), a presença de *Helicobacter pylori* (OR=1,82; CI: 1,05-3,15), habitação sem sistema de saneamento básico (OR=9,63; CI: 1,10-72,70) e contacto com animais de companhia (OR=1,10; CI: 1,81-3,25), principalmente os cães. (Tabela 1)

Este estudo revelou uma alta frequência de infeção por *G. duodenalis* em crianças assintomáticas residentes no distrito de Lisboa (Figura 1). O fator diretamente associado ao risco de ocorrência de infeção mostrou ser o nível educacional dos pais, sugerindo que o incremento na educação parental possa influenciar de forma positiva o bem-estar das crianças portuguesas. Foi observada a co-deteção de *G. duodenalis* e *H. pylori* e parece uma questão importante que merece ser investigada futuramente.

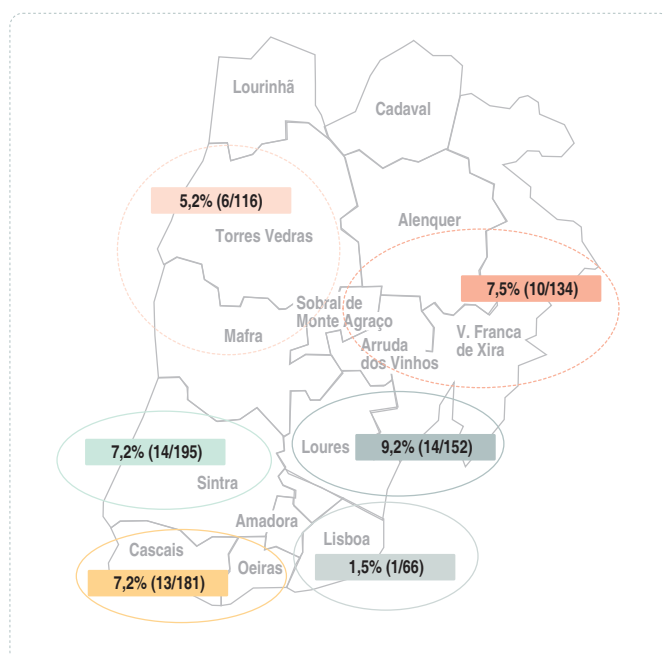
Alguns estudos sobre a prevalência da giardíase a nível mundial mostraram que existe uma separação clara dos países desenvolvidos para os países em desenvolvimento, refletindo principalmente as diferenças a nível socioeconómico. No entanto, esta abordagem é de alguma forma limitada, mesmo nos países desenvolvidos, devido à trilogia entre nível socioeconómico e educacional/nível de saneamento/controlo veterinário dos animais de estimação, sendo estes elos importantes na manutenção da parasitose.

artigos breves_ n. 9

Tabela 1: Fatores de risco e sua associação com a frequência de infecção por *G. duodenalis*.

Fatores de Risco (nº total)	n	Resultados positivos (%)	p	Risco Estimado (OR)	Intervalo de Confiança (95%)
Género (n=844)					
Masculino	446	31 (6,9)	0,891	1,06	0,62 – 1,82
Feminino	398	26 (6,5)		1,00	
Idade (n=844)					
0 – 5 anos	403	31 (7,8)	0,268	1,41	0,82 – 2,43
6 – 15 anos	441	26 (5,8)		1,00	
Nível educacional materno (n=828)					
Sem escolaridade	13	3 (23,0)	0,047	4,49	1,20 – 16,84
Com escolaridade	815	51 (6,2)		1,00	
Nível educacional paterno (n=812)					
Sem escolaridade	14	6 (42,8)	<0,001	12,26	4,08 – 36,82
Com escolaridade	798	46 (5,7)		1,00	
Infeção por <i>Helicobacter pylori</i> (n=821)					
Sim	56	25 (44,6)	0,037	1,82	1,05 – 3,15
Não	756	235 (30,7)		1,00	
Sistema de saneamento (n=839)					
Não	5	2 (40,0)	0,038	9,63	1,10 – 72,70
Sim	834	54 (6,4)		1,00	
Contacto c/ animais de companhia (n=839)					
Sim	452	34 (8,7)	0,026	1,10	1,81 – 3,25
Não	387	22 (4,8)		1,00	

Figura 1: Mapa do distrito de Lisboa com as frequências de *G. duodenalis* encontradas em cada concelho.



Referências bibliográficas:

- (1) Cacciò SM, Sprong H. Epidemiology of Giardiasis in Humans. In *Giardia: A Model Organism* (eds HD Luján, S Svård). New York: Springer Wien, 2011, 420pp. ISBN 978-3-7091-0197-1.
- (2) Robertson LJ, Hanevik K, Escobedo AA, et al. Giardiasis – Why do the symptoms sometimes never stop? *Trends Parasitol.* 2010; 26(2): 75-82.
- (3) Yoder J, Beach M. Giardiasis Surveillance – United States, 2003-2005. *Surveill Summ* 2007; 56(SS07): 11-18.

Deteção molecular de *V. cholerae* O1 e O139 e caracterização genotípica dos fatores de virulência em estirpes clínicas de *V. cholerae* isoladas em Angola: resultados preliminares

Lurdes Monteiro ¹, Francisca Reis Van-Dúnem ²,
Anabela Vilares ¹, Joana Sami ², Erika Oliveira ²,
Filomena Gomes da Silva ²
m.lurdes.monteiro@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Investigação e Desenvolvimento.

Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(2) Instituto Nacional de Saúde Pública, Luanda, Angola.

Introdução

As pandemias de cólera, causadas por serogrupos específicos de *V. cholerae* que apenas são patogénicos para o homem, têm sido descritas desde 1817. Presume-se que as primeiras sete foram causadas pelo serogrupo O1, em que a sétima pandemia (1961) ainda se encontra activa e tem tido um impacto severo em três continentes. A sexta pandemia terminou em 1923, mas o clone persistiu até aos anos 90. Vários surtos de cólera foram descritos após o desaparecimento da sexta pandemia e antes do início da sétima pandemia, em que as estirpes isoladas foram caracterizadas como sendo do biótipo El Tor ao contrário das estirpes da quinta e sexta pandemia, pertencentes ao biótipo clássico. Os surtos com estirpes El Tor ocorreram na Indonésia e no Médio Oriente (1926-1960) e são referidas como estirpes pré-pandémicas devido ao facto de terem sido consideradas como precursores da sétima pandemia, que também é devida a estirpes do biótipo El Tor. Em Outubro de 1992, um novo serogrupo, definido como O139, causou um grave surto de cólera no sudoeste da Índia. Em 10 meses este serogrupo disseminou por toda a Índia e igualmente para 11 países vizinhos desalojando o serogrupo O1. Desde essa altura ambos os serogrupos coexistem e são responsáveis por grandes surtos. Estudos genómicos indicam que a estirpe epidémica O139 apareceu por aquisição horizontal de um único ADN. Tradicionalmente a classificação de *V. cholerae* é realizada serologicamente e requer cerca de 200 antígenos baseados no antígeno somático O. As estirpes de *V. cholerae* dividem-se em três subgrupos principais, O1, O139, e não O1/não O139, dos quais somente os serogrupos O1 e O139 se encontram associados a pandemias e epidemias de cólera. Os serogrupos não epidémicos (não O1 e não O139) podem ser patogénicos e são reconhecidos como agentes causais de surtos esporádicos e localizados.

Os vibrios ingeridos a partir de água e alimentos, contaminados, têm que passar através da barreira ácida do estômago antes de colonizarem a zona superior do intestino grosso. A colonização faz-se com o apoio de fímbrias, estruturas proteicas filamentosas denominadas pilis coreguladores de toxina (TCP) que são extensões da parede celular que aderem aos recetores da mucosa e através da mobilidade da bactéria que ajudam a penetrar na camada de muco. A adesão dos vibrios à mucosa permite que a enterotoxina (toxina colérica) produzida seja eficientemente enviada para as células da mucosa. Esta toxina interfere com o equilíbrio electrolítico dos intestinos, sendo responsável pela ativação da adenil ciclase que conduz a um aumento do AMP cíclico, seguido de um aumento da secreção de cloreto e inibição da natural absorção de cloreto de sódio nas vilosidades do intestino provocando uma massiva excreção de fluidos para o lúmen do intestino grosso. O volume excretado excede a capacidade normal de absorção do intestino e resulta numa diarreia aquosa contendo grandes quantidades de sódio, cloreto, bicarbonato, e potássio. As fezes de doentes com cólera contêm elevadas concentrações de vibrios (10^8 bactérias por g de fezes) e são altamente infecciosas.

A análise genética do genoma de *V. cholerae* revelou a presença de dois importantes elementos genéticos que distinguem uma estirpe patogénica de *V. cholerae* de uma estirpe inócua. A patogenidade das estirpes de *V. cholerae* O1 e O139 depende de uma combinação de fatores, incluindo a enterotoxina (toxina colérica [CT], *ctxA*) e a sua capacidade de adesão, e colonização do intestino grosso (fator de colonização *tcpA*). Os principais factores de virulência encontram-se presentes em grupos. O primeiro é o genoma de um bacteriófago lisogénico designado CTXφ que comporta os genes que codificam para a toxina colérica e o segundo o ilhéu de patogenidade do vibrio (VPI) que comporta os genes do fator de colonização, pilis coreguladores de toxina (TCP). Outros fatores têm sido igualmente associados com a enteropatogenicidade e incluem uma hemolisina idêntica ao El Tor (*hlyA*), uma enterotoxina termo estável (*stn/sto*), hemaglutininas, neuraminidase (*nanH*), proteína de membrana externa (*ompU*), toxina Shiga like (*stx*), uma proteína reguladora ToxR e uma toxina zonula ocludente (*zot*). Os métodos de diagnóstico convencionais (fenotípicos) utilizados para a deteção e classificação de estirpes de *V. cholerae* isoladas de amostras clínicas e ambientais requerem vários dias e envolvem a cultura em água peptonada alcalina, meio TCBS (tiosulfato, citrato, bilis, sais de sucrose), aglutinação em lâmina com antígenos específicos e teste para a deteção de produção da toxina colérica. No entanto *V. cholerae* O1 e O139 podem ser detetados rapidamente por técnicas moleculares assim como a distinção entre estirpes toxigenicas e não toxigenicas.

O primeiro caso conhecido de pandemia de cólera em Angola ocorreu em 1971. A epidemia durou 4 anos e causou 2453 casos notificados e 117 óbitos. Em 1987 uma outra epidemia iniciou-se no município do Soyo, na Província do Zaire e difundiu-se nas 18 Províncias de Angola.

artigos breves_ n. 10

Esta epidemia de cólera sazonal recorrente resultou em aproximadamente 112.184 casos e mais de 7.120 mortos. De 1995 a 2006, apenas se registaram casos esporádicos. Entre 2006 e 2008 verificou-se uma nova epidemia sobretudo nas regiões costeiras com um total de cerca de 84.000 casos e cerca 3.150 mortos (1). A confirmação laboratorial de casos de cólera é efetuada no Instituto Nacional de Saúde Pública de Angola (INSP) utilizando os métodos fenotípicos. A cólera continua a ser um grave problema de Saúde Pública em Angola. Mais, o serogrupo O1, biótipo El Tor, deslocou-se da Ásia tendo causado pandemia em África e na América do Sul durante os últimos 35 anos. O novo serogrupo, O139, apareceu no sul da Ásia em 1992, tornou-se endémico na região, e ameaça iniciar uma nova pandemia. Atualmente verifica-se um elevado afluxo de indivíduos provenientes das zonas endémicas de *V. cholerae*, nomeadamente Ásia, devido a acordos de cooperação para a vinda de operários, principalmente na área da construção civil. Estes indivíduos vivem habitualmente em comunidade fechada, e por vezes em condições precárias de saneamento o que favorece a existência e disseminação de *V. cholerae*. Olhando para a história das epidemias de *V. cholerae* e com o actual movimento de populações a probabilidade de ocorrência do serótipo O139 em Angola é real. Este trabalho tem como objetivo a implementação de metodologias moleculares para caracterização de *V. cholerae* no INSP, nomeadamente: confirmação molecular dos serogrupos O1, O139 e não O1/não O139; confirmação molecular dos biótipos El Tor e Clássico utilizando o gene *tcpA*; determinação da presença dos genes associados aos fatores de virulência: *ctxA*, *tox*, *ace*, *omp* e *zot*.

Métodos

De um universo de 534 estirpes caracterizadas fenotipicamente como *V. cholerae* pertencentes à coleção existente no INSP, serão caracterizadas, geneticamente, todas as estirpes que se encontrem viáveis. Estas estirpes são provenientes de doentes com suspeita de cólera e cujas amostras de fezes foram analisadas no INSP. As estirpes da coleção do INSP têm sido conservadas em meio de conservação sólido em tubo, por picada central e à temperatura ambiente. A sua recuperação consistiu, na sua sementeira em água peptonada durante 4 horas e em seguida passagem para meio de TCBS. Todas as repicagens que evidenciaram a presença de colónias amarelas características neste meio, foram em seguida conservadas por congelamento em meio TSI com glicerol a - 80°C.

De igual modo a partir das culturas frescas de *V. cholerae* em TCBS foi efetuada uma suspensão de uma ansa de 10 µl de UFC em 500 µl de água estéril para extração de ADN pelo método de fervura. Este método consistiu em ferver durante 15 minutos a referida suspensão e em seguida centrifugar durante 5 minutos a 3000 rpm. As técnicas moleculares utilizadas foram aferidas no Departamento de Doenças Infecciosas do INSA de Lisboa e em seguida transmitidas para o Laboratório de Biologia Molecular do INSP (LBM). Assim, para a confirmação do serogrupo foram utilizados iniciadores específicos de *V. cholerae* O1e O139 segundo Hoshino *et al.* (2). Para a caracterização

dos diferentes genes de virulência e distinção do biótipo clássico e El Tor foram utilizados iniciadores descritos por Singh *et al.* (3). A aferição das diferentes reações de amplificação foi realizada utilizando ADN de 18 estirpes de *V. cholerae* da coleção de estirpes do INSA entre elas, 4 estirpes de controlo de qualidade (2 do serótipo O1 Ogawa, 1 do serótipo O1 Inaba e 1 do serótipo não O1). Para o serótipo O139, foi-nos gentilmente cedido, pelo Instituto Pasteur de Paris, ADN de uma estirpe de *V. cholerae* O139.

Nas Figuras seguintes encontram-se alguns exemplos das diferentes reações de PCR aferidas.

Figura 1 : Exemplo de um gel com estirpes de *V. cholerae* O1.

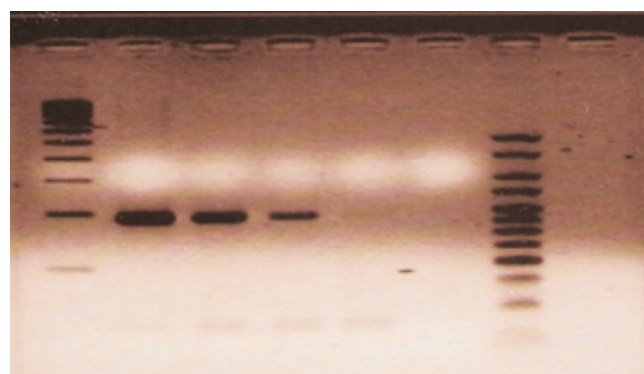
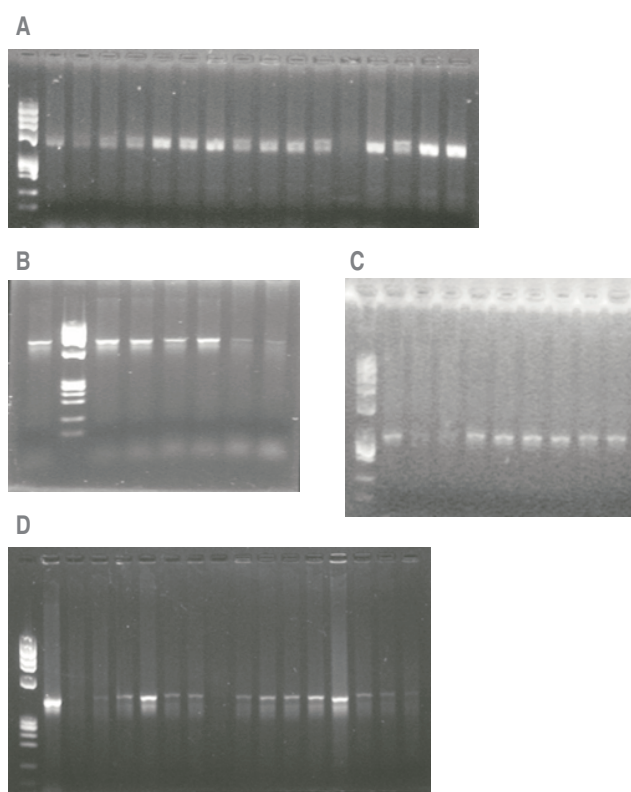


Figura 2 : A: gene *ctxA*; B: gene *tox*; C: gene *ace*; D: gene *tcpA*.



→ continua

artigos breves_ n. 10

_Atualmente no LBM do INSP, das cerca de 200 estirpes, até agora recuperadas, 115 estão a ser submetidas às diferentes reações de amplificação. Para tal, foram efetuadas diferentes diluições (1/1; 1/10; 1/100) de cada ADN extraído e em seguida amplificadas com as condições de reação descritas por Hoshino *et al.* (2) para a caracterização do serótipo e por Singh *et al.* (3) para os diferentes genes de virulência.

_Resultado e conclusões

Até ao momento 75 estirpes confirmaram a presença do serótipo O1, 47 estirpes a presença do gene *ctxA* e 22 a presença do *gene tox*.

_A metodologia apresentada permite a deteção rápida de *V. cholerae* dos serogrupos O1 e O139 assim como a distinção entre estirpes toxinogénicas e não toxinogénicas. Mais, com o conhecimento dos diferentes genes associados à virulência da estirpe é possível realizar o mapeamento dos diferentes fatores de virulência presente nas estirpes isoladas, quer clínicas, quer ambientais.

_A implementação deste método molecular permitiu, igualmente, introduzir o conceito de vigilância epidemiológica molecular no INSP e iniciar a caracterizações das estirpes de *V. cholerae* circulantes em Angola.

Referências bibliográficas:

- (1) Organização Mundial da Saúde. Epidemia de cólera em Angola. Boletim nº 67, 2008.
- (2) Hoshino K, Yamasaki S, Mukhopadhyay AK, et al. Development and evaluation of a multiplex PCR assay for rapid detection of toxigenic *Vibrio cholera* O1 and O139. FEMS Immunol. Med. Microb. 1998;20:201-207.
- (3) Singh DV, Isac SR, Colwell RR. Development of a hexaplex PCR assay for rapid detection of virulence and regulatory genes in *Vibrio cholera*. J. Clin. Microbiol. 2002;40:4321-4324.

ficha técnica

Título: Boletim Epidemiológico Observações

Periodicidade: Trimestral

ISSN: 2182-8873 (em linha)

ISSN: 0874-2928

Numeração: 2ª série,
Volume 2, número especial 1
Maio 2013

Diretor

José Pereira Miguel, Presidente do INSA

Editores

Carlos Matias Dias, Departamento de Epidemiologia
Elvira Silvestre, Biblioteca

Conselho Editorial Científico

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

© Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP 2013.

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

Isento de Registo na ERC ao abrigo do Decreto-Regulamentar 8/99 de 9 de Junho artº 12º nº1 a).

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

Tel.: (+351) 217 519 200

Fax: (+351) 217 529 400

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

www.insa.pt