01

RPDI

REVISTA PORTUGUESA DE DOENÇAS INFECCIOSAS

UTUBRO :: DEZEMBRO 2004

ÓRGÃO OFICIAL DA SOCIEDADE PORTUGUESA DE DOENÇAS INFECCIOSAS

08 **Erhlichiose Granulocítica Humana**

Revisão dos aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais da ehrlichiose granulocítica humana, uma zoonose emergente na Europa

14 **Infecção Congénita pelo vírus Citomegalo**

O VCM é o vírus associado com maior frequência a infecção congénita em países desenvolvidos, com uma incidência de 0,4-2,2% do total de nascimentos

18 **Protocolo Laboratorial**

O sarampo permanece ainda responsável por cerca de 900 mil mortes anuais, num total de 30 milhões de novos casos, constituindo a mais mortal doença de infância prevenível por vacinação



Sociedade Portuguesa de Doenças Infecciosas

www.spdi.org



1	2	3
1 comprimido	2 vezes ao dia	3 fármacos associados

TRIZIVIR®

sulfato de abacavir 300 mg + lamivudina 150 mg + zidovudina 300 mg

UM COMPRIMIDO 2 VEZES DIA

a simplicidade existe

LIDERANÇA NA TERAPÊUTICA ANTI-RETROVÍRICA

gsk GlaxoSmithKline

Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas

Órgão Oficial da Sociedade Portuguesa de Doenças Infecciosas

Ano I | Volume I | N.º I (3.ª Série) - Outubro/Dezembro de 2004 | Publicação Trimestral

Corpos Gerentes da SPDI

Direcção do Biénio 2003/2004

Direcção

Presidente
Prof. António Meliço-Silvestre
Vice-Presidente
Prof. Saraiva da Cunha
Secretário
Dr. António Vieira
Tesoureiro
Dr. Kamal Mansinho
Vogal
Dr. Rui Sarmento e Castro

Assembleia-geral

Presidente
Prof. Francisco Antunes
Vice-Presidente
Dr. J. Luís Boaventura
Secretário
Dr. Fernando Maltez
Vogal
Dra. Helena Coelho

Conselho Fiscal

Presidente
Prof. Mota Miranda
Relator
Dr. Rui Alberto Marques
Vogal
Dra. Emília Encarnação Valadas

Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas

Director
Prof. António Meliço-Silvestre

Director Honorário
Prof. Carvalho Araújo

Conselho Redactorial
Dr. Fernando Maltez
Dr. Germano do Carmo
Prof. Melo Cristino
Prof. Henrique Lecour
Dr. Kamal Mansinho
Prof. Saraiva da Cunha

Comissão Executiva
Dr. António Vieira
Dr. Germano do Carmo
Dr. Kamal Mansinho
Prof. Saraiva da Cunha

Conselho Científico
Dr. Abílio Morgado (Lisboa)
Dr. Alves Pereira (Porto)
Prof. A. Meliço Silvestre (Coimbra)
Dr. A. Rocha Marques (Porto)
Prof. António Sarmento (Matosinhos)
Dr. António Vieira (Coimbra)
Prof. A. Torres Pereira (Lisboa)
Prof. Armando Porto (Coimbra)
Prof. Armindo Filipe (Lisboa)
Dr. Carlos Araújo (Lisboa)
Prof. Cerqueira Magro (Porto)
Prof. David Morais (Évora)
Prof. F. Carvalho Araújo (Lisboa)
Dr. Fernando Maltez (Lisboa)
Prof. Francisco Antunes (Lisboa)
Prof. Henrique Lecour (Porto)
Prof. J. David de Paiva (Lisboa)
Dr. J. Mello Vieira (Lisboa)
Prof. J. Saraiva da Cunha (Coimbra)
Dr. Jorge Nóbrega Araújo (Funchal)
Dr. José Neves (Lisboa)
Dr. Kamal Mansinho (Lisboa)
Dra. Leonor Carvalho (Lisboa)
Dr. Nogueira Lemos (Coimbra)
Dra. Maria João Águas (Almada)
Prof. Melo Cristino (Lisboa)
Prof. Mota Miranda (Porto)
Dr. Pita Groz Dias (Lisboa)
Dr. Rui Proença (Lisboa)
Dr. Rui Sarmento e Castro (Porto)

In Memoriam
Prof. Francisco Cambournac
Dr. José Luís Champalinaud
Prof. Júlio Machado Vaz
Prof.ª Laura Ayres
Prof. R. Carrington da Costa
Dr. Rui Dias de Sousa

A Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas é uma revista médica trimestral (publicam-se os números de: Janeiro/Março; Abril/Junho; Julho/Setembro e Outubro/Dezembro) excluída do registo no ICS de acordo com a alínea a) do art. 12.º do DR n.º8/99 de Junho de 1999

FICHA TÉCNICA

Director Prof. Meliço Silvestre **Propriedade** Sociedade Portuguesa de Doenças Infecciosas - Av. Óscar Monteiro Torres, n.º 16, R/c Esq.º, 1000-219 Lisboa - Telf. 217 817 180; Fax: 217 951 299; E-mail: spdi_dir@hotmail.com; rpdi@hotmail.com **Edição e Publicidade** DSGN - Comunicação e Imagem, Lda. Campo Pequeno, n.º 50, 4.º Esq.º - 1000-081 Lisboa - Telf. 217 981 065; Fax: 217 981 068; E-mail: dsgn@netcabo.pt **Design, Paginação e Pre-press** DSGN - Comunicação e Imagem, Lda. **Impressão** Gráficas EUJOA, SA - Polígono Industrial Meres, Astúrias - Espanha **Tiragem** 5000 exemplares **Depósito Legal** 134201/99 **Distribuição** CTT

Número Avulso 8,75 euros **Assinatura Anual** Portugal - 25 Euros | Europa - 35 Euros | Outros Países - 45 Euros
Reservados todos os direitos, de acordo com a lei. Copyright SPDI

ÍNDICE

INDEX



Artigo de Revisão | Pág. 08



Artigo Original | Pág. 14



Protocolo Laboratorial | Pág. 18

RPDI | Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas | Nº 1

04 **Editorial**
Prof. António Meliço-Silvestre

08 **Artigo de Revisão**
Erhlichiose Granulocítica Humana

14 **Artigo Original**
Infecção Congénita pelo Vírus Citomegalo

18 **Protocolo Laboratorial**
Optimização de um Protocolo de Reacção em Cadeia da Polimerase para o Diagnóstico de Infecção por Vírus do Sarampo

27 **Agenda**
Eventos na área das Doenças Infecciosas

28 **Internet**
Sites de referência sobre doenças infecciosas

30 **Carta ao Editor**
Dr. J. A. David Morais

32 **Forum**
Opiniões dos Leitores

Artigo Original

Artigo de Revisão

Protocolo Laboratorial

Entrevista

Actualidades

Carta ao Editor

Internet

Agenda

Forum



















EDITORIAL

Doenças Infecciosas

Um desafio permanentemente renovado



Prof. Meliço-Silvestre
Director da RPDI e Presidente da SPDI

As Doenças Infecciosas, num impulso de destruição no confronto com o Homem, colocam-nos dilemas impensáveis desde há séculos infindos.

A Globalização é já hoje uma realidade com os seus contrastes e contradições, e o lugar onde hoje pontualmente me encontro, numa localização em pleno continente Americano, ligeiros 5 graus abaixo do Equador, é disso uma evidente realidade e reflecte-se naturalmente no pensamento transcrito em editorial.

A Globalização é já hoje uma realidade com os seus contrastes e contradições

E relembro as descobertas, no "achamento" do Brasil onde me encontro, e a guerra biológica da varíola que dizimou milhares de índios sul-americanos, num processo macabro, que antecipou em séculos as guerras biológicas de hoje.

Do anthrax à varíola, supostamente extinta, mas que renasceu das cinzas como ameaça cataclísmica, muito em particular sobre os jovens não imunizados, impreparados imunológicamente para qualquer defesa, num cenário de possível repetição da história dos índios americanos, que ao confiarem nos conquistadores espanhóis e nos "aconchegantes" cobertores contaminados com o vírus da varíola por eles oferecidos, se deixaram dizimar.

E, falando do equador, reflicto sobre as condições propícias ao paludismo que um dia me marcou, na forma brutal da "black fever", nas paradisíacas ilhas da República de S. Tomé e Príncipe, num meu primeiro contacto com África. Malária, o maior carrasco do homem a nível planetário e que em Portugal foi possível debelar como resultado de programas bem estruturados e eficazes, nos vestígios lançados para a história dos Centros Anti-palúdicos de Águas de Moura ou de Montemor-o-Velho. Mas malária que ainda espreita por um regresso ao nosso País, muito pelo desconcerto da actuação do homem, responsável pelo aquecimento global do planeta Terra, ultrapassando Kyoto e os acordos internacionais estabelecidos.

Malária, o maior carrasco do homem a nível planetário e que em Portugal foi possível debelar como resultado de programas bem estruturados e eficazes, nos vestígios lançados para a história dos Centros Anti-palúdicos de Águas de Moura ou de Montemor-o-Velho

EDITORIAL

É a malária, a tuberculose e a Sida, hoje a grande preocupação mundial dos nossos mais altos dirigentes

É a malária, a tuberculose e a Sida, hoje a grande preocupação mundial dos nossos mais altos dirigentes.

Sida que alastra, numa crescente preocupação, num imenso desafio, na força da pandemia, na marca da discriminação, só alguma vez sentida, no opróbrio da lepra.

Doenças infecciosas na repetição da história de milénios, nos equilíbrios/desequilíbrios que, em si próprias têm a capacidade de gerar novas mutações

Doenças infecciosas na repetição da história de milénios, nos equilíbrios/desequilíbrios que, em si próprias têm a capacidade de gerar novas mutações, potenciais inícios de outros ciclos, tantas e tantas vezes muito mais patogénicos e letais.

São, a título de exemplo local e actual, os casos fatais registados de uma doença infecciosa com que Portugal convive de forma endémica desde sempre, a febre escaro-nodular, a conhecida febre da carraça, que normalmente cursa de forma benigna se atempadamente diagnosticada e tratada, mas que nos últimos anos tem por vezes ressurgido com maior gravidade, desencadeando mesmo a morte em surtos preocupantes.

Ou, a nível planetário a imensa preocupação da O.M.S. quando lança a forte suspeita, quase já uma certeza, do contágio entre humanos da epidemia da gripe das aves, resultado das combinações possíveis do vírus da gripe das aves com o da gripe humana, um foco potencial de grave pandemia global.

Depois do SARS, na patogenicidade de um coronavirus, que alarmou o Mundo pela mortalidade e facilidade de disseminação de países em desenvolvimento para países desenvolvidos, causador da desagregação da economia asiática em mais de 40%, de novo o H_5N_1, protegido pelo caldo de cultura em que se transformaram países como a Tailândia, que ainda recentemente recebeu o Congresso Mundial de Sida, e onde senti estar-se perante nova disseminação deste vírus por quase todas as suas províncias.

Era o início de um alarme, que num ápice se transfigurou em preocupante realidade.

Em suma, são as doenças infecciosas como processo cósmico, que o homem teve de defrontar e que felizmente até hoje conseguiu controlar, por vezes a que preço, em milhões de anos de trajecto comum.

São desafios imensos que, no entanto, não se compadecem com facilitismos ou negligências criminosas.

E neste contexto, a globalização, possibilitando à OMS estruturar e implementar estratégias e decisões globais, revela-se de importância capital.

NOTA:
Os corpos directivos da Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas expressam o seu agradecimento às empresas da indústria farmacêutica que possibilitaram a renovação desta publicação periódica com mais de duas dezenas de anos, particularmente à GSK, que permitiu a publicação deste número inicial da III série da revista.

Programa de Apoio ao Ensino Pós-Graduado na Área do VIH/SIDA



Bolsas de Estudo · Bolsas de Mérito · Prémios de Melhor Dissertação · Apoio Bibliográfico · Apoio à participação

Atribuição de:

Bolsas de Estudo a alunos de Cursos de Pós-Graduação ou Mestrado

Bolsas de Mérito a alunos em fase de dissertação de Cursos de Mestrado

Prémios de Melhor Dissertação

Outros apoios ao ensino Pós-graduado/Investigação:

Apoio bibliográfico

Apoio à participação em Congressos, Conferências, Workshops e acções de Formação de curta duração

Candidaturas entre 1 de Setembro e 31 de Outubro

Para mais informações, consulte o folheto informativo do regulamento.

www.cnlcs.pt

Apoio Bibliográfico · Apoio à participação · Bolsas de Estudo · Bolsas de Mérito · Prémios de Melhor Dissertação · Apoio Bibliográfico · Apoio à participação

Bolsas de Estudo · Bolsas de Mérito · Prémios de Melhor Dissertação · Apoio Bibliográfico · Apoio à participação · Bolsas de Estudo · Bolsas de Mérito · Prémios de Melhor Dissertação · Apoio Bibliográfico · Apoio à participação

Portugal em Acção | Ministério da Saúde

Comissão Nacional Luta contra a SIDA



Ehrlichiose Granulocítica Humana
Conceitos actuais*

A. Santos[1], F. Bacellar[1], J. David de Morais[2]

1 Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Águas de Moura.
2 Departamento de Ecologia, Universidade de Évora, Évora.
* O primeiro autor foi apoiado por uma bolsa atribuída pela "Fundação para a Ciência e Tecnologia" (ref.ª BD/8610/2002).

EHRLICHIOSE HUMANA

A ehrlichiose é uma doença infecciosa tradicionalmente associada aos animais, que afecta diversos mamíferos domésticos e silváticos. É conhecida há mais de meio século, desde a descrição da ehrlichiose canina em 1935[1,2] e da ehrlichiose bovina e ovina em 1936[3,4]. Nas últimas décadas, esta doença tem merecido um interesse crescente em medicina humana, o que veio conduzir a intensas investigações nesta área até então considerada exclusivamente do âmbito veterinário.

Em termos etiológicos, a ehrlichiose é causada por bactérias Gram negativas intracelulares obrigatórias, que se desenvolvem no interior dos vacúolos fagossómicos de células eucariotas[5]. O ciclo de transmissão destes microrganismos inclui a infecção tanto de artrópodes vectores (essencialmente carraças) como de hospedeiros vertebrados. Nestes últimos, são infectadas predominantemente as células de origem hematopoiética, com excepção dos eritrocitos. Em termos taxonómicos, estes microrganismos foram reunidos num único grupo: o género *Ehrlichia* (pertencente à tribo Ehrlichiaeae, família Rickettsiaceae, ordem Rickettsiales). Estudos filogenéticos, com base em técnicas de biologia molecular, têm vindo a demonstrar a sua heterogeneidade e a proximidade de alguns dos seus membros com outros microrganismos. Assim, foi proposta a reclassificação de algumas ehrlichias no género *Neorickettsia* e no género *Anaplasma*, mantendo-se no género *Ehrlichia* apenas algumas das espécies originalmente descritas[6] (vide Quadro I). Compreender-se-á, pois, que quando hoje em dia falamos de "ehrlichioses" estamos, na verdade, do ponto de vista etiológico, a utilizar um termo que inclui afinal ehrlichioses propriamente ditas mas também anaplasmoses humanas, designativo este que, em rigor, deveríamos utilizar, e que por certo terá tendência a impor-se no futuro.

Embora, o primeiro caso de ehrlichiose humana (febre de Sennetsu) tenha sido documentado no Japão, em 1954,[7] a doença foi considerada de reduzida importância médica. Na verdade, esta ehrlichiose causada por *Neorickettsia* (*Ehrlichia*) *sennetsu* é pouco frequente e de gravidade moderada, não havendo registos de mortalidade associados, ocorrendo apenas em áreas limitadas do Extremo Oriente, raramente fora do Japão. Só nas últimas décadas do século XX, com a descoberta de outras ehrlichias associadas a patologias humanas de gravidade variável no Ocidente, é que foi radicalmente alterada a forma como a comunidade científica encarava a problemática da ehrlichiose humana.

Em 1986, foi diagnosticada pela primeira vez a ehrlichiose monocítica (ou monocitotrópica) humana (EMH), nos E.U.A..[8] Esta doença foi associada a uma nova espécie, designada por *Ehrlichia chaffeensis*.[9,10] Mais tarde, em 1994, foram descritos os primeiros casos de ehrlichiose granulocítica (ou granulocitotrópica) humana (EGH).[11] Como a identidade exacta do agente envolvido nesta doença era desconhecida, foi adoptada a designação de "agente da EGH". Em 1996, foram descritos na Venezuela casos de infecção humana por um agente semelhante a *Ehrlichia canis* (agente etiológico da ehrlichiose monocítica canina).[12] Mais recentemente, em 1999, também *Ehrlichia ewingii* (conhecido agente da ehrlichiose granulocítica canina) foi implicada em casos de ehrlichiose humana nos E.U.A..[13]

Actualmente, a EMH e a EGH são consideradas as ehrlichioses humanas mais importantes em Saúde Pública, não só pela sua alargada distribuição geográfica, mas também pela casuística que lhes está associada. Estas ehrlichioses ocorrem essencialmente nos Estados Unidos, havendo também registos da sua presença noutros pontos do globo. Na Europa, existem referências de infecção humana por um agente imunologicamente semelhante a *E. chaffeensis* em Portugal,[14] Espanha[15] e Bélgica.[16] Porém, estudos recentes apontam para que seja a EGH a ter um papel de relevo nos países europeus.

Com a presente revisão da EGH pretendemos alertar os clínicos para os principais aspectos epidemiológicos e clínicos, bem como para o diagnóstico e tratamento desta ehrlichiose, à semelhança do que já havia sido feito, por um de nós, para a EMH.[17]

EHRLICHIOSE GRANULOCÍTICA HUMANA

ETIOLOGIA

Como já foi referido, a ehrlichiose granulocítica humana é causada por um agente que permaneceu, até há bem pouco tempo, sem nomenclatura oficial, tendo sido designado por agente da EGH. Nos anos seguintes ao seu isolamento, foram reunidos dados genéticos,[11,18] antigénicos[19,20] e biológicos que sugeriam a existência de uma estreita relação com *Ehrlichia phagocytophila* (agente da febre da carraça dos ruminantes) e *Ehrlichia equi* (agente da ehrlichiose granulocítica equina), defenden-



do-se que representariam diferentes estirpes de uma única espécie. Actualmente essa hipótese está confirmada, e além disso há evidências da proximidade genética entre estes microrganismos e os anaplasmas, o que levou a que fosse proposta a sua reclassificação no Género *Anaplasma*, como uma única espécie, com a designação de *Anaplasma phagocytophila*[6,21](vide Fig. I).

EPIDEMIOLOGIA

Desde que foi descrita pela primeira vez no Minnesota e Wisconsin, em 1994, a EGH têm vindo a ser sucessivamente identificada em diversos estados americanos, apresentando actualmente uma vasta distribuição geográfica nos Estados Unidos. Ao contrário da EMH, que está confinada à região Sul e Sudoeste, esta ehrlichiose ocorre predominantemente na região Nordeste e Noroeste do País, apresentando nas áreas endémicas uma frequência semelhante à verificada para a borreliose de Lyme.[22] O principal ixodídeo vector é *Ixodes scapularis*, também implicado na transmissão de *Borrelia burgdorferi* (agente etiológico da borreliose de Lyme) e de *Babesia microti* (associada a casos de babesiose humana). O ciclo epidemiológico do agente envolve pequenos roedores e ruminantes silváticos, principalmente veados, que servem de hospedeiros vertebrados aos artrópodes vectores.[23,24,25,26,27] Esta doença afecta um largo espectro de mamíferos, incluindo equídeos, ruminantes, canídeos e o Homem.[20,28,29,30,31] A infecção humana está associada ao contacto com o ixodídeo vector. No entanto, a descrição de um caso de infecção perinatal[32] e a associação da doença à manipulação de carne fresca de cervídeos[33] realça a existência de vias alternativas de infecção.

O crescente interesse por este tema e o desenvolvimento de linhas de investigação a nível mundial revelaram evidências significativas de que EGH não está confinada apenas aos Estados Unidos, ocorrendo também noutros países, principalmente da Europa. O contacto com *A. pahagocytophila* (estirpe agente da EGH) foi detectado em estudos serológicos realizados no Reino Unido,[34] Suíça,[35] Noruega,[36] Suécia[37] e Espanha.[38] Estudos moleculares também identificaram a presença de ADN específico do agente em carraças *Ixodes ricinus* capturadas na Itália,[39] Suécia,[40] França,[41] Eslovénia,[42] Alemanha,[43] Holanda,[44] Suíça,[45] Portugal[46] e Espanha[38]. Há também uma referência à detecção de ADN específico em ácaros *Neotrombicula autumnalis* em Espanha.[47] Estes dados sugerem que *A. phagocytophila* apresenta uma larga distribuição geográfica na Europa, partilhando o mesmo biótopo que o agente da borreliose de Lyme e sendo transmitido pelo mesmo ixodídeo vector (*I. ricinus*). Embora a sua associação a patologias humanas seja, até à data, reduzida,[48,49] julga-se provável que esta realidade possa estar subavaliada devido possivelmente à falta de sensibilização dos clínicos e à escassez de laboratórios com o diagnóstico específico.

CLÍNICA

O tempo médio de incubação da ehrlichiose humana cifra-se em cerca de oito dias.[50]

Comparativamente com a ehrlichiose monocítica, a ehrlichiose granulocítica costuma cursar com quadros clínicos mais moderados (vide Quadro II). A sintomatologia mais frequente da EGH inclui febre, arrepios, mal-estar geral, cefaleias e mialgias, podendo estas ser muito intensas. Cerca de metade dos doentes podem também apresentar anorexia, náuseas, vómitos, dores abdominais, diarreia, tosse e artralgias.[51] Em menos de 10% dos casos pode coexistir *rash* cutâneo.[52,53] Embora raramente, o quadro clínico pode evoluir para rabdomiólise, miocardite, falência respiratória aguda, *shock* séptico, polineuropatia desmielinizante, meningite asséptica e meningoencefalite.[52,53,54,55,56,57,58] Os casos mais graves e que requerem períodos mais prolongados de internamento hospitalar respeitam muitas vezes a indivíduos idosos, diabéticos, pacientes com doenças vasculares do colagénio, imunodeprimidos e casos de diagnóstico tardio de ehrlichiose.[51] Estão também referidas complicações importantes do quadro clínico em indivíduos a quem foi administrada terapêutica antibiótica prévia com co-trimoxazol, como aliás acontece nas ricketsioses em geral.[59]

A mortalidade na EGH cifra-se entre 0,5 e 1%, enquanto na EMH costuma ser mais elevada: 2,7%.[51]

DIAGNÓSTICO

A hipótese de ehrlichiose deverá ser posta face a quadros febris de origem incerta com:

- história de picada de ixodídeo e/ou exposição a ixodídeos em área endémica nas duas semanas prévias;
- existência de trombocitopenia e leucopenia;
- aumento dos valores das transaminases séricas.

Nestes casos os testes laboratoriais são imprescindíveis, visto ser virtualmente

impossível o diagnóstico definitivo da EGH apenas com base em aspectos epidemiológicos e clínicos.[60] Os testes laboratoriais disponíveis são de dois tipos: directos, que visam a detecção do agente (exame microscópico, análise molecular e isolamento) ou indirectos, que detectam anticorpos produzidos na sequência da infecção (análises sero-imunológicas).[61]

Como *A. phagocytophila* infecta células de origem mielocítica, apresentando um marcado tropismo por neutrófilos, sangue total com anti-coagulante (preferencialmente sem heparina) e aspirado medular (se clinicamente apropriado) são as amostras mais adequadas para a realização dos testes directos. Este material biológico deve ser obtido durante a fase aguda da doença, antes da instituição da terapêutica antibiótica. As amostras devem ser refrigeradas a 4ºC, mantidas no recipiente de colheita para garantir condições de esterilidade (situação indispensável caso se pretenda fazer o isolamento do agente) e enviadas no frio para o laboratório (idealmente nas 24h subsequentes à colheita). As amostras de soro ou plasma dos doentes destinam-se apenas aos testes imunológicos. É importante salientar que 60% dos doentes com suspeita de ehrlichiose apresentam resultados serológicos negativos na fase aguda da doença, verificando-se que mais de 80% destes casos desenvolvem posteriormente níveis de anticorpos detectáveis.[60] O estudo da cinética dos anticorpos da EGH tem mostrado que o aparecimento de imunoglobulinas específicas ocorre durante a segunda semana de doença, verificando-se uma elevação dos títulos até às quatro a seis semanas, permanecendo elevados durante vários meses.[61,62] É pois recomendável para os testes indirectos o envio de duas amostras de soro/plasma do doente: a primeira, o mais precocemente possível, seguida de uma segunda amostra colhida 4 a 8 semanas depois.[60]

O exame microscópico é realizado por observação dos esfregaços de sangue periférico corados por Giemsa ou *Diff Quick* para pesquisa de agregados bacterianos intra-leucocitários (mórulas). No entanto, devido à leucopenia que frequentemente é observada durante a fase aguda da EGH e ao baixo nível de infecção celular é recomendável a realização de uma concentração leucocitária e a observação de 800-1000 granulocitos por esfregaço.[61] Todavia, importará referir que, nos EUA, a detecção de mórulas na primeira semana, só ocorreu em cerca de 62% dos casos de EGH[63] e que na Europa ela tem sido bastante mais rara.[64] Acrescenta-se ainda a possibilidade de ocorrerem falso positivos. A presença de granulações intra-leucocitárias (como granulações tóxicas ou corpos de Döhle) e a sobreposição de plaquetas ou partículas contaminantes poderão ser confundidas com mórulas de ehrlichia.[60] Assim, o exame microscópico não deverá por si só ser suficiente para confirmar o diagnóstico de EGH.

A análise molecular é uma alternativa. A reacção de polimerase em cadeia (PCR) é a técnica molecular de eleição para o diagnóstico da EGH. A sensibilidade desta técnica varia entre 67-87% e a especificidade é próxima dos 100%.[65] Existem diversos pares de oligonucleotidos que podem ser usados na detecção das estirpes de *A. phagocytophila* por PCR. Na sua grande maioria amplificam segmentos do gene que codifica a sub-unidade 16S do ARN ribossomal ou a região do operão *gro*ESL.[11,18]

O isolamento do agente é ainda outra técnica directa para confirmar o diagnóstico de EGH. A cultura de ehrlichias é correntemente realizada em células HL-60,[66] mas esta técnica só está disponível em laboratórios especializados. Demais, o crescimento das ehrlichias poderá levar vários dias ou até mais de duas semanas, tornando moroso o resultado da confirmação laboratorial.

Em termos práticos, é pois nas análises sero-imunológicas que muitas vezes assenta o diagnóstico definitivo de ehrli-

Quadro I - Classifica;ão actual e principais aspectos epidemiológicos dos agentes tradicionalmente associados a ehrlichioses

Agente etiológico	Doença	Vectores/Hospedeiros	Tropismo celular
Género *Ehrlichia*			
E. canis	Ehrlichiose monocítica canina	Ixodídeos/Canídeos	Leucocitos mononucleares
E. chaffeensis	Ehrlichiose monocítica humana	Ixodídeos/Cervídeos, canídeos e homem	Leucocitos mononucleares
E. ewingii	Ehrlichiose granulocítica canina	Ixodídeos/Canídeos e homem	Leucocitos polimorfonucleares
E. muris	Provoca esplenomegalia	Ixodídeos/Roedores	Leucocitos mononucleares
Género *Anaplasma*			
A. phagocytophila (*Ehrlichia phagocytophila*)	Febre da carraça dos ruminantes	Ixodídeos/Ruminantes	Leucocitos polimorfonucleares
A. phagocytophila (*Ehrlichia equi*)	Ehrlichiose granulocítica equina	Ixodídeos/Equídeos	Leucocitos polimorfonucleares
A. phagocytophila (agente da EGH)	Ehrlichiose granulocítica humana	Ixodídeos/Ruminantes, equídeos, canídeos e homem	Leucocitos polimorfonucleares
A. bovis (*Ehrlichia bovis*)	Ehrlichiose bovina	Ixodídeos/Ruminantes	Leucocitos mononucleares
A. platys (Ehrlichia platys)	Trombocitopenia cíclica infecciosa dos canídeos	Ixodídeos/Canídeos	Plaquetas
Género *Neorickettsia*			
N. sennetsu (*Ehrlichia sennetsu*)	Febre de Sennetsu	Trematódos/Homem	Leucocitos mononucleares
N. risticii (*Ehrlichia risticii*)	Síndroma diarreíco agudo dos equídeos	Trematódos/Equídeos	Leucocitos mononucleares

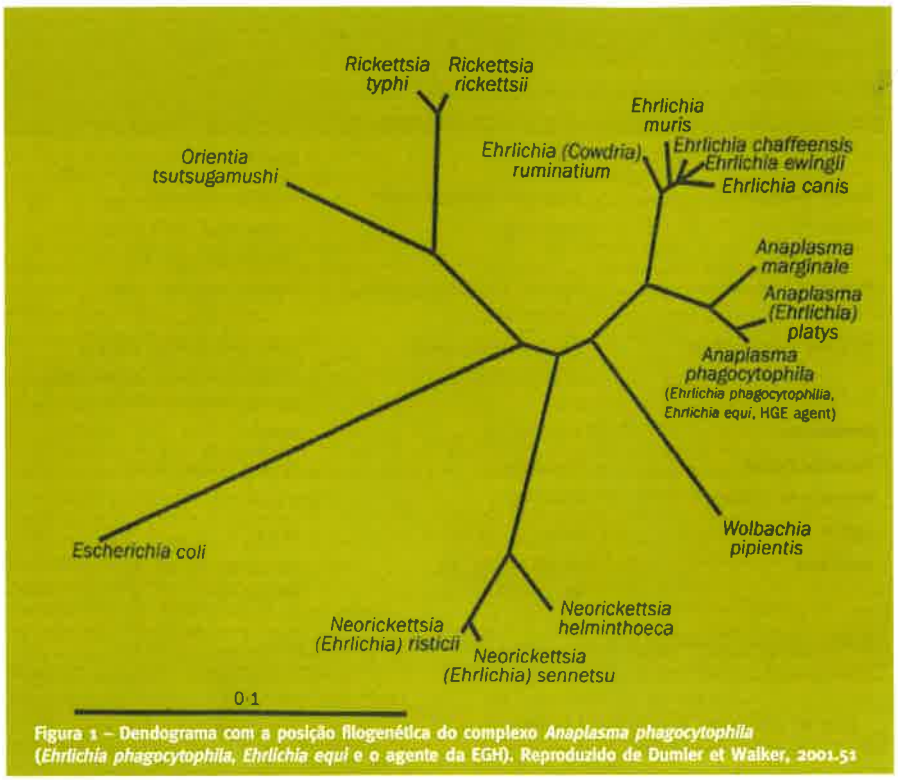


Figura 1 – Dendograma com a posição filogenética do complexo *Anaplasma phagocytophila* (*Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* e o agente da EGH). Reproduzido de Dumler et Walker, 2001.[51]

chiose. A pesquisa de imunoglobulinas das classes M e G por imunofluorescência indirecta (IFA) é a técnica aconselhada.[60] Devem ser usados como antigénio isolados de *A. phagocytophila* (estirpes *E. phagocytophila*, *E. equi* ou agente da EGH) e o limiar de positividade (diluição a partir da qual um soro deve ser considerado positivo) deve ser determinado por cada laboratório.[60] A sensibilidade da IFA nos casos de EGH confirmados por exame cultural é superior a 95%.[61] Outros testes serológicos como ELISA e Imunoblot, com microrganismos purificados ou com proteínas recombinantes, estão a ser desenvolvidos e tudo indica que a curto prazo possam vir a ser aplicados correntemente no diagnóstico da EGH.[67,68,69,70]

A confirmação laboratorial de um caso de EGH, com diagnóstico clínico compatível, é definida por: (i) seroconversão; (ii) alteração do título de anticorpos de pelo menos quatro vezes, relativamente ao título do soro inicial; (iii) detecção de mórulas no exame microscópico, associado a PCR positivo; (iv) isolamento do agente em cultura celular. Considera-se ainda como caso provável a detecção de mórulas intra-leucocitárias ou a presença de uma única amostra de soro com título superior ao limiar de positividade.[60,62,71]

O Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas (CEVDI) dispõe actualmente do teste de IFA para a detecção de infecções pelo agente EGH. Nesta análise é utilizado antigénio comercial (# IF 1402, Focus Technologies), bem como antigénio fornecido Prof. Stephen Dumler, da Divisão de Microbiologia Médica do Departamento de Patologia, Johns Hopkins Medical Institutions, EUA.

TRATAMENTO

Para além da terapêutica sintomática eventualmente necessária, o tratamento de escolha da ehrlichiose assenta na prescrição da doxiciclina. A dose habitualmente recomendada é de 100 mg, 2 vezes/dia, durante uma semana, ou mais três a cinco dias após a defervescência da febre. Todavia, em áreas endémicas de borreliose de Lyme, o tratamento deverá ser mantido, em princípio, durante duas a três semanas, dada a possibilidade de existência de infecção simultânea pelas duas zoonoses.[43,72] Uma vez que o diagnóstico laboratorial poderá demorar algum tempo, frente a um caso de suspeita de ehrlichiose a terapêutica antibiótica apropriada deverá ser logo instituída.[73]

In vitro, as ehrlichias mostraram-se também sensíveis à rifamicina e à rifampicina, sendo este último antibiótico habitualmente preferido em grávidas infectadas.[74]

As ehrlichias não evidenciaram sensibilidade às cefalosporinas, aminoglicosídeos, macrólidos e cloranfenicol,[51,52] pelo que são questionáveis alguns pretensos bons resultados obtidos com tais antibióticos. Recorde-se que nos casos mais frustres de ehrlichiose a sintomatologia pode regredir espontaneamente sem qualquer terapêutica, além de poderem existir casos assintomáticos, como o atestam os inquéritos sero-epidemiológicos.

Como já antes dito, face a um diagnóstico presuntivo de ehrlichiose a terapêutica com co-trimoxazol deverá ser completamente banida.

COMENTÁRIO FINAL

No caso concreto de Portugal, a descoberta do agente da EGH em território nacional e a sua associação ao ixodídeo vector implicado na transmissão da *B. burgdorferi*[6] poderá ter amplas implicações em Saúde Pública.

A borreliose de Lyme só agora começou a merecer mais atenção por parte das entidades oficiais, sendo desde 1999 uma doença de declaração obrigatória.[75] Contudo, do universo de episódios febris supostamente relacionados com a borreliose de Lyme, apenas numa parte dos casos este diagnóstico é confirmado laboratorialmente.[76,76] Assim, e à luz desta nova descoberta, é possível que algumas dessas situações "não conclusivas" sejam de facto resultantes da infecção humana por este novo agente. Deverá também ser considerada a possibilidade de infecções conjuntas do agente EGH e de *B. burgdorferi*, à semelhança do que se verifica noutros países onde estes dois agentes coexistem. [37,78,79,80]

CORRESPONDÊNCIA

Ana Sofia Santos. Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. 2965 Águas de Moura, Portugal.
Telef. 265 912 222; Fax. 265 912 155;
e-mail: ana.santos@insa.min-saude.pt

SUMÁRIO

A ehrlichiose humana representa um dos melhores exemplos de doenças infecciosas emergentes, com a ehrlichiose granulocítica humana (EGH) a merecer o papel de maior destaque na Europa. Esta doença é causada por um conhe-

cido agente de interesse veterinário *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophila*. Estudos recentes demonstraram que este agente ocorre em vários países europeus, designadamente Portugal, partilhando a mesma área geográfica do agente da borreliose de Lyme, e sendo transmitido pelo mesmo ixodídeo vector (*Ixodes ricinus*). Embora o número de casos de infecção humana por este agente seja até à data reduzido, os autores discutem o facto desta zoonose poder estar subavaliada devido possivelmente à falta de sensibilização dos clínicos e à escassez de laboratórios equipados para o diagnóstico específico. Este artigo aborda os principais aspectos epidemiológicos, clínicos, de diagnóstico e tratamento da EGH. Os autores pretendem também divulgar que o CEVDI tem à disposição técnicas serológicas para o diagnóstico laboratorial de EGH.

Quadro II
Principais aspectos epidemiológicos, clínico e laboratoriais distintivos das duas principais ehrlichioses humanas

	EGH	EMH
Agente etiológico	*Anaplasma phagocytophila*	*Ehrlichia chaffeensis*
Vector	*Ixodes* spp.	*Amblyomma americanum* *Dermacentor variabilis*
Principais hospedeiros	Homem, cervídeos, roedores, cavalos, cães	Homem, cervídeos, cães
Principal sintomatologia	Febre, mal-estar geral, cefaleias, mialgias	Idem, rash cutâneo, falência respiratória aguda, falência renal aguda, meningoencefalite
Mortalidade	0,5 a 1%	2,7%
Tropismo celular	Neutrófilos	Monocitos/macrófagos
Presença de mórulas	10 a 73%	0 a 1%
Cultura de células	HL60	DH82
Imunoblot	25, **40**, 42, **44**, 46, **65**, 110 kD	22, 25, **27**, **29**, **44**, 55, 66, 120 kD

Quadro adaptado de Bakken et Dumler, 2000 e Dumler et Walker, 2001.51,63

ABSTRACT

Human ehrlichiosis represent one of the best examples of newly emergent infectious diseases with human granulocytic ehrlichiosis (HGE) standing out as the most relevant in Europe. This disease is caused by a well-known veterinary pathogen *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophila*. Recent studies suggest that this agent may occur broadly across several European countries, including Portugal, within the same geographic range as the Lyme borreliosis agent and sharing the same vector tick (*Ixodes ricinus*). Although the number of human infection is few, the authors discuss the possibility that this zoonotic disease could be underestimated due to a lack of physician awareness and unavailability of current laboratory diagnosis. This article focuses on the epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment of HGE. The authors also point out that CEVDI has already available serologic tests for the diagnosis of HGE.

BIBLIOGRAFIA

1 - Donatien A, Lestoquard F. Existence en Algérie d'une *Rickettsia* du chien. *Bull Soc Path Exot* 1935; 27: 418-9.
2 - Donatien A, Lestoquard F. État Actuel des Connaissances sur les Rickettsioses Animales. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie* 1937; 15(2): 162-77.
3 - Donatien A, Lestoquard F. *Rickettsia bovis*, novelle espèce pathogène pour le bœuf. *Bull Soc Path Exot* 1936 ; 29 : 1057-61.
4 - Donatien A, Lestoquard F. Sur une nouvelle rickettsia du mouton. *Bull Soc Path Exot* 1936; 29 : 105-8.
5 - Ristic M, Huxsoll DL. Tribe II. *Ehrlichiae* Philip 1957. In: Krieg NR, Holt JG (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. I. Baltimore: Williams & Wilkins; 1984; p, 704-11.
6 - Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51(6): 2145-65.
7 - Misao T, Kobayashi Y. Studies on infectious mononucleosis (glandular fever). I. Isolation of etiologic agent from blood, bone marrow and lymph node of a patient with infectious mononucleosis by using mice. *Kyushu J Med Sci* 1955; 6:145-52.
8 - Maeda K, Markowitz N, Hawley RC, Ristic M, Cox D, McDade JE. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. *N Eng J Med* 1987; 316: 853-6.
9 - Dawson JE, Anderson BE, Fishbein DB, Sanchez JL, Goldsmith CS, Wilson KH, et al. Isolation and characterization of an *Ehrlichia sp.* from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29(12): 2741-5.
10 - Anderson BE, Dawson JE, Jones DC, Wilson KH. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29(12): 2838-42.
11 - Chen S-M, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH. Identification of a granulocytotropic ehrlichia species as the etiologic agent of human diseases. *J Clin Microbiol* 1994; 32(3): 589-95.
12 - Perez M, Rikihisa Y, Wen B. Ehrlichia canis-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *J Clin* Microbiol 1996; 34(9): 2133-9.
13 - Buller RS, Arens M, Hmiel SP, Paddock CD, Sumner JW, Rikihisa Y, et al. *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. *N Engl J Med* 1999; 341(3): 148-55.
14 - David de Morais JA, Dawson JE, Greene C, Filipe AR, Galhardas LC, Bacellar F. First european case of ehrlichiosis. *Lancet* 1991; 338: 633-4.
15 - Saz JV, Dawson JE, Bacellar F, Merino FJ, Filipe A. A propósito de la ehrlichiosis humana en España. *Enfermedades Infecciosas e Microbiologia Clinica* 1994; 7(7): 357-8.
16 - Pierard D, Levtchenko L, Dawson JE, Lauwers S. Ehrlichiosis in Belgium. *Lancet* 1995; 346: 1233-4.
17 - David de Morais JA. Epidemiologia e clínica da ehrlichiose humana. A propósito do primeiro caso diagnosticado na Europa. *Rev Port Doenças Infec* 1992; 15(1): 7-18.
18 - Sumner JW, Nicholson WL, Massung RF. PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the groESL heat shock operon of *Ehrlichia* species. *J Clin Microbiol* 1997; 35(8): 2087-92.
19 - Dumler JS, Asanovich KM, Bakken JS, Richter P, Kimsey R, Madigan JE. Serologic cross-reactions among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila* and human Granulocytic Ehrlichia. *J Clin Microbiol* 1995; 33(5): 1098-103.
20 - Barlough JE, Madigan JE, DeRock E, Dumler JS, Bakken JS. Protection against *Ehrlichia equi* is conferred by prior infection with the human granulocytotropic ehrlichia (HGE agent). *J Clin Microbiol* 1995; 33(12): 3333-34.
21 - Yu X-J, Zhang X-F, McBride JW, Zhang Y, Walker D. Phylogenetic relationships of *Anaplasma marginale* and "*Ehrlichia platys*" to other *Ehrlichia* species determined by GroEL amino acid sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51: 1143-6.
22 - Dumler JS. The ehrlichioses: an overview. *Infect Dis Review* 1999; 1(2):110-2.
23 - Telford SR, Dawson JE, Katavolos P, Warner CK, Kolbert CP, Persing DH. Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 6209-14.
24 - Belongia EA, Reed KD, Mitchell PD, Kolbert CP, Persing DH, Gill JS, et al. Prevalence of granulocytic *Ehrlichia* infection among white-tailed deer in Wisconsin. *J Clin Microbiol* 1997; 35(6): 1465-68.
25 - Walls JJ, Greig B, Neitzel DF, Dumler JS. Natural infection of small mammal species in Minnesota with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 1997; 35(4): 853-5.

26 - Nicholson WL, Muir S, Sumner JW, Childs JE. Serologic evidence of infection with *Ehrlichia spp.* in wild rodents (Muridae: Sigmodontinae) in the United States. *J Clin Microbiol* 1998; 36(3): 695-700.
27 - Nicholson WL, Castro MB, Kramer VL, Sumner JW, Childs JE. Dusky-footed wood rats (*Neotoma fuscipes*) as reservoirs of granulocytic ehrlichiae (Rickettsiales: Ehrlichieae) in Northern California. *J Clin Microbiol* 1999; 37(10): 3323-7.
28 - Greig B, Asanovich KM, Armstrong PJ, Dumler, JS. Geographic, clinical, serologic and molecular evidence of Granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. *J Clin Microbiol* 1996; 34(1): 44-8.
29 - Madigan JE, Barlough JE, Dumler JS, Schankman NS, DeRock E. Equine granulocytic ehrlichiosis in Connecticut caused by an agent resembling the human granulocytotropic ehrlichia. *J Clin Microbiol* 1996; 32(2): 434-5
30 - Pusterla N, Huder J, Wolfensberger C, Litschi B, Parvis A, Lutz H. Granulocytic ehrlichiosis in two dogs in Switzerland. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(9): 2307-9.
31 - Pusterla N, Pusterla JB, Deplazes P, Wolfensberger C, Muller W, Horauf A, et al. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* and Canine granulocytic ehrlichia infection in Dogs in Switzerland. *J Clin Microbiol* 1998; 36(12): 3460-2.
32 - Horowitz HW, Kilchevsky E, Haber S, Aguero-Rosenfeld M, Kranwinkel R, James EK, et al. Perinatal transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N Engl J Med* 1998; 339: 375-8.
33 - Bakken JS, Krueth J, Lund T, Malkovitch D, Asanovich K, Dumler JS. Exposure to deer blood may be a cause of human granulocytic ehrlichiosis. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 198.
34 - Sumption KJ, Wright DJ, Cutler SJ, Dale BA. Human ehrlichiosis in the UK. *Lancet* 1995; 346(2): 1487-88.
35 - Brouqui PH, Dumler JS, Lienhard R, Brossard M, Raoult D. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Lancet* 1995; 346(16):782-3.
36 - Bakken JS, Krueth J, Tilden RL, Dumler JS, Kristiansen BE. Serological evidence of human granulocytic ehrlichiosis in Norway. *Eur J Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 829-32.
37 - Dumler JS, Dotevall L, Gustafson R. A Population–based seroepidemiologic study of human granulocytic ehrlichiosis and Lyme borreliosis on the west coast of Sweden. *J Infect Diseases* 1997; 175: 720-2.
38 - Oteo JA, Gil H, Barral M, Pérez A, Jimenez S, Blanco JR, et al. Presence of granulocitic ehrlichia in ticks and serological evidence of human infection in La Rioja, Spain. *Epidemiol Infect* 2001; 127: 353-8.
39 - Cinco M, Padovan D, Murgia R, Maroli M, Frusteri L, Heldtander M, et al. Coexistence of *Ehrlichia phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks Italy as determined by 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol* 1997; 35:3365-66.
40 - Von Stedingk LV, Gurtelschmid M, Hanson HS, Gustafson R, Dotevall L, Engvall EO, et al. The human granulocytic ehrlichiosis (HGE) agent in Swedish ticks. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3:573-4.
41 - Parola P, Beati L, Cambon M, Brouqui P, Raoult D. Ehrlichial DNA amplified from *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in France. *J Med Entomol* 1998; 35: 180-3.
42 - Petrovec M, Sumner JW, Nicholson WL, Childs JE, Strle F, Barlic J, et al. Identity of ehrlichial DNA sequences derived from *Ixodes ricinus* ticks with those obtained from patients with human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. *J Clin Microbiol* 1999; 37(1): 209-10.
43 - Baumgarten BU, Rollinghoff M, Bogdan C. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and granulocytic and monocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks from southern Germany. *J Clin Microbiol* 1999; 37(11): 3448-51.
44 - Schouls LM, Van De Pol I, Rijpkema SGT, Schot CS. Detection and identification of *Ehrlichia, Borrelia burgdorferi sensu lato*, and *Bartonella* species in dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol* 1999; 37(7): 2215-22.
45 - Pusterla N, Leutenegger CM, Huder JB, Weber R, Braun U, Lutz H. Evidence of human granulocytic ehrlichiosis agent in *Ixodes ricinus* ticks in Switzerland. *J Clin Microbiol* 1999; 37(5):1332-4.
46 - Núncio MS, Schouls LM, Van De Pol I, Bacellar F, Filipe A. The role of *Ixodes ricinus* as a vector of zoonotic agents in Madeira Island. Oxford: Seventh Bienal Meeting of European Tick Study Group; 28 de Abril 2000.
47 - Fernández-Soto P, Manzano R, García-Varas S, Madrazo C, Pérez-Sánchez R, Encinas A. Las larvas de *Neotrombicula autumnalis* son probables vectores de *Ehrlicia phagocytophila*. *Acta Parasitológica Portuguesa* 2001; 8: 325.
48 - Petrovec M, Furlan SL, Zupanc TA, Strle F, Brouqui P, Roux V, et al. Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. *J Clin Microbiol* 1997; 35(6): 1556-9.
49 - Lotric-Furlan S, Petrovec M, Zupanac TA, Nicholson WL, Sumner JW, Childs JE, et al. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe: clinical and laboratory findings for four patients from Slovenia. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 424-8.
50 - Walker DH, Dumler JS. Emergence of the ehrlichiose as human health problems. *Emerg Infect Dis* 1996; 2: 18-28.
51 - Dumler JS, Walker DH. Tick-borne ehrlichioses. *Lancet Infectious Diseases*, April 2001: 21-8.
52 - Aguero-Rosenfeld ME, Horowitz HW, Wormser GP, Mckenna DF, Nowakowski J, Muñoz J. Human granulocytic ehrlichiosis: a case series from a medical center in New York State. *Ann Intern Med* 1996; 125: 904-8.
53 - Bakken JS, Krueth J, Wilson-Nordskog C, Tilden RL, Asanovich K, Dumler JS. Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. *JAMA* 1996; 275: 199-205.
54 - Horowitz HW, Marks SJ, Weintraub M, Dumler JS. Brachial plexopathy associated with human granulocytic ehrlichiosis. *Neurology* 1996; 46: 1026-9.
55 - Shea KW, Calio AJ, Klein NC, Cunha BA. *Ehrlichia equi* infection associated with rhabdomyolysis. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 605.
56 - Wong S, Grady LJ. Ehrlichia infection as cause of severe respiratory distress. *N Eng J Med* 1996; 334: 273.
57 - Bakken JS, Erlemeyer AS, Kanoff RJ, Silvestrini TC, Goodwin DD, Dumler JS. Demyelinating polyneuropathy associated with human granulocytic ehrlichiosis. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 1323-4.
58 - Jahangir A, Kolbert C, Edwards W, Mitchell P, Dumler JS, Persing DH. Fatal pancarditis associated with humam granulocytic ehrlichiosis in a 44-year-old man. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 1424-7.
59 - Peters TR, Edwards KM, Standaert SM. Severe ehrlichiosis in an adolescent taking trimethroprim--sulfamethoxazole. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19: 170-1.
60 - Walker DH. Task Force on Consensus Approach for Ehrlichiosis. Diagnosing human ehrlichiosis: current status and recommendations. *ASM News* 2000; 66(5):287-90.
61 - Aguero-Rosenfeld ME, Kalantarpour F, Baluch M, Horowitz HW, Mckenna DF, Raffalli JT, et al. Serology of culture-confirmed case of human granulocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 635-8.
62 - Aguero-Rosenfeld ME. Diagnosis of HGE - state of art. Presentation summaries of the *IX International Conference on Lyme Borreliosis and Other Tick-borne Diseases*. New York; 18-22 Ago. 2002, p. 93-6.
63 - Bakken JS, Dumler JS. Ehrlichiosis. In: Cunha BA, edit. *Tick-borne Infectious Diseases*. New York: Marcel Dekker; 2000, p. 139-68.
64 - McQuiston JH, Paddock CD, Holman RC, Childs JE. The human ehrlichioses in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 635-42.
65 - Lotric-Furlan S, Petrovec M, Avsic-Zupanc T, Nicholson WL, Sumner JW, Childs JE, et al. Human ehrlichiosis in central Europe. *Wien Klin Wochenschr* 1998; 110: 894-7.
66 - Olano JP, Walker DH. Human ehrlichiosis. *Medical Clinics of North America* 2002; 86(2): 375-91.
67 - Goodman JL, Nelson C, Vitale B, Madigan JE, Dumler JS, Munderloh UG. Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 209-215.
68 - Ravyn MD, Goodman JL, Kodner CB, Westad DK, Coleman LA, Engstrom SM, et al. Imunodiagnosis of human granulocytic ehrlichiosis by using culture-derived human isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36(6): 1480-8.
69 - Zhi N, Ohashi N, Rikihisa Y, Horowitz HW, Wormser GP, Hechemy K. Cloning and expression of the 44 kilodanton major outer membrane protein gene of the human granulocytic ehrlichiosis agent and application of the recombinant protein to serodiagnosis. J Clin Microbiol 1998; 36: 1666-73.
70 - Ijdo JW, Wu C, Magnarelli LA, Fikrig E. Serodiagnosis of human granulocytic ehrlichiosis by a recombinant HGE-44-based enzyme-linked immunos orbent assay. *J Clin Microbiol* 1999; 37(11): 3540-4.
71 - Unver A, Felek S, Paddock CD, Zhi N, Horowitz HW, Wormser GP, et al. Western blot análisis of sera reactive to human monotytic ehrlichiosis and human granulocytic ehrlichiosis agents. J Clin Microbiol 2001; 39(11): 3982-6.
72 - CDC – Centers for Diseases Control and Prevention. Case definitions for infectious conditions under public health surveillance. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997; 46: 46-7.
73 - Nadelman RB, Horowitz HW, Hsieh T-C, Wu JM, Aguero-Rosenfeld ME, Schwartz IS, et al. Simultaneous human granulocytic ehrlichiosis and Lyme borreliosis. *N Eng J Med* 1997; 337: 27-30.
74 - Schaffner W, Standaert SM. Ehrlichiosis - in pursuit of an emerging infection. *N Eng J Med* 1996; 334: 262-3.
75 - Buitrago MI, Ijdo JW, Rinaudo P, Simon H, Copel J, Gadbaw J, et al. Human granulocytic ehrlichiosis during pregnancy treated successfully with rifampin. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 213-5.
76 - DGS. Doenças de declaração obrigatória 1995-1999. Lisboa: Direcção de Serviços de Informação e Análises, Divisão de Epidemiologia, Direcção-Geral de Saúde; 2000, p. 53.
77 - David de Morais JA, Leitão AL, Páscoa B, Filipe AR, Núncio MS. Doença de Lyme A nossa experiência clínica na região do Alentejo. *Rev Port Doenças Infec* 1992; 15(4): 227-45.
78 - Núncio-Soares MS. Contribuição para o estudo de borrélias e borreliose de Lyme em Portugal. Tese doutoral. Lisboa: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa; 2002.
79 - Mitchell PD, Reed KD, Hofkes JM. Immunoserologic evidence of coinfection with *Borrelia burgdorferi, Babesia microti* and Human Granulocytic Ehrlichia species in residents of Wisconsin and Minesota. *J Clin Microbiol* 1996; 34(3): 724-7.
80 - Magnarelli LA, Ijdo JW, Anderson JF, Padula SJ, Flavell RA, Fikrig E. Human exposure to a granulocytic ehrlichia and other tick-borne agents in Connecticut. *J Clin Microbiol* 1998; 36(10):2823-7.
81 - Bjoersdorff A, Brouqui P, Eliasson I, Massung RF, Wittesjo B, Berglund J. Serological evidence of ehrlichia infection in swedish Lyme borreliosis patients. *J Infect Dis* 1999; 31(1): 51-5.



Infecção Congénita pelo Vírus Citomegalo

Resultados Preliminares de Estudo Prospectivo*

Sílvia Lopo[1], Paula Palminha[1], Marina Pité[1], Tânia Caçador[1], Elsa Vinagre[1], Maria Amável Pereira[1], Maria Teresa Paixão[1], Maria João Brito[2], José Maria Garrote[2], Helena Carreira[2], Maria Céu Machado[2]

1 Unidade de Herpes vírus/Rubéola, Centro de Virologia, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa.
2 Departamento de Pediatria, Hospital Fernando Fonseca, Amadora.

RESUMO

O vírus Citomegalo (VCM) é o vírus mais frequentemente associado à infecção congénita, com uma incidência de 0,5-2,2% do total de nascimentos nos países desenvolvidos. Em Portugal desconhece-se a incidência de infecção congénita pelo VCM. Apresentamos os resultados preliminares de um estudo prospectivo de diagnóstico de infecção congénita por este vírus; determinámos a proporção de crianças infectadas, morbilidade, mortalidade e sequelas da infecção congénita pelo VCM num grupo de recém-nascidos do Hospital Fernando Fonseca. Estudámos 757 recém-nascidos consecutivos, estabelecendo-se o diagnóstico laboratorial pelo isolamento viral em urina colhida nos primeiros dias de vida. O PCR foi efectuado no sangue do cordão em 653 casos. A infecção congénita pelo VCM foi diagnosticada em 5/757 casos (0,7%) estando os recém-nascidos assintomáticos ao nascer; em 2 casos foram detectados sinais/sintomas de doença no primeiro mês de vida. Não foi detectado genoma do vírus nos sangues do cordão. A proporção de infecção congénita está de acordo com a descrita na literatura. O isolamento do VCM na urina do recém-nascido mostrou ser a técnica indicada no diagnóstico de infecção congénita, com melhores resultados que a técnica de PCR no sangue do cordão. As crianças infectadas, sintomáticas/assintomáticas serão seguidas clínica/laboratorialmente até aos 36 meses de vida.

ABSTRACT

Cytomegalovirus (CMV) is considered the most frequent cause of congenital infections, occurring in approximately 0.5-2.2% of all live births. There is no knowledge about the incidence of CMV congenital infection in Portugal. We report the results of a prospective study on the diagnosis of congenital CMV infection where we determine the proportion of infected neonates, morbidity, mortality and sequelae in a group of neonates from Hospital Fernando-Fonseca. Seven hundred seven consecutive newborns were studied for diagnosis of CMV congenital infection. Laboratory diagnosis was established by isolation of CMV from urine, during the first days of life. In 653 cases where cord blood was available, PCR was performed. Congenital CMV infection was diagnosed in 5/757 cases (0.7%) all asymptomatic. Two newborns showed signs/symptoms of congenital CMV disease during the first month of life. In all samples of cord blood CMV viral genome was not detected. In this prospective study, the intrauterine proportions transmission is in agreement with literature. The isolation of CMV in shell-vial from urine was a reliable method for the diagnostic of congenital CMV infection, as opposed to PCR in cord blood. Infected newborns both symptomatic and asymptomatic will be followed for 36 months.

INTRODUÇÃO

O VCM é um vírus sem predomínio sazonal conhecido, mas com uma prevalência de infecção que varia nos Estados Unidos entre 50% e 85% em adultos (1). Em Portugal ainda não foram efectuados estudos que nos permitam conhecer a prevalência do VCM na população.

O VCM é o vírus associado com maior frequência a infecção congénita em países desenvolvidos, com uma incidência de 0,4-2,2% do total de nascimentos (2,3) sendo responsável por casos de mortalidade e morbilidade neonatal; é também frequente a infecção assintomática no período neonatal, mas que se vem a manifestar em sequelas tardias nas crianças.

Em Portugal não há conhecimento da incidência da infecção congénita por este vírus e não existe linha condutora obrigatória no que respeita ao screening do VCM em exame antenatal e/ou durante a gravidez.



A infecção materna pelo VCM na maioria dos casos é assintomática ou cursa com sintomas inespecíficos como febre, odinofagia, fadiga e mau estar. Analiticamente pode existir apenas leucopenia com linfocitose. A transmissão ocorre por via orofaríngea e genital e em ambos os casos pode ocorrer transmissão transplacentar. Numa infecção primária materna, a transmissão do VCM ao feto é de aproximadamente 40%; este valor baixa para aproximadamente 0,5% em mulheres com imunidade pré-existente para o vírus antes da concepção (4, 5). No entanto, se ocorrer infecção intrauterina o feto pode vir a não ser afectado pelo VCM.

Cinco a 15% das crianças infectadas pelo VCM são sintomáticas no período neonatal com manifestações clínicas que incluem calcificações intracranianas, icterícia, hepatoesplenomegalia e púrpura ou petéquias; 30 a 60% das crianças manifestam sequelas tardiamente tais como, perda de audição, diminuição da acuidade visual, corioretinite, atraso psicomotor, alterações neuromusculares, microcefalia, atraso mental, entre outros. Nas crianças com infecção congénita pelo VCM assintomáticas no período neonatal, a infecção passa facilmente despercebida, não sendo possível diagnosticar nem tratar a criança precocemente.

Com base em estudos anteriores realizados noutros países (6), apresentamos os resultados preliminares de um estudo prospectivo de diagnóstico da infecção congénita pelo VCM num grupo de recém-nascidos consecutivos do Hospital Fernando Fonseca.

OBJECTIVO

Determinar a proporção de crianças infectadas, bem como a morbilidade, mortalidade e sequelas da infecção congénita pelo VCM num grupo de recém-nascidos consecutivos, do Hospital Fernando Fonseca, na região de Lisboa, no espaço de 3 meses.

METODOLOGIA

População estudada

Entre Maio e Agosto de 2002, foram estudados 757 recém-nascidos consecutivos, para o diagnóstico clínico e laboratorial da infecção congénita pelo VCM, com o consentimento informado de todas as mães incluídas no projecto.

Foram obtidos registos sobre os ante-cedentes familiares do recém-nascido e condições socioeconómicas, bem como sobre a história clínica neonatal das crianças.

Nos casos laboratorialmente diagnosticados foi efectuado um follow-up aos 3 e 6 meses que incluiu avaliação neurológica, auditiva, oftalmológica e de desenvolvimento do estado ponderal e psicomotor. As crianças infectadas pelo VCM são seguidas clinicamente de forma periódica.

Técnicas laboratoriais

O diagnóstico laboratorial da infecção congénita por VCM foi efectuado pelo isolamento viral (técnica shell-vial) em urina colhida nos primeiros dias de vida. A detecção do genoma viral pela técnica de amplificação enzimática do ADN (PCR) efectuou-se no sangue do cordão dos casos disponíveis e na urina dos casos em que o isolamento viral foi positivo.

Foram realizados periodicamente testes serológicos e isolamento do VCM nos recém-nascidos com infecção intrauterina. Estas crianças continuam, de forma periódica, a ser seguidas laboratorialmente.

Isolamento viral

Utilizou-se a técnica de cultura rápida shell-vial no isolamento do VCM das urinas dos 757 recém-nascidos estudados.

Os produtos foram inoculados em tubos shell-vial sobre uma monocamada de células MRC5 (Vircell S.L. Santa Fe, Granada, Espanha), que cresce em lamelas removíveis, seguindo-se uma centrifugação a baixa velocidade (30', 300 g) e incubação (60', 37ºC).

Quadro I
Follow-up laboratorial dos recém-nascidos assintomáticos e sintomáticos infectados congenitamente pelo VCM e das suas

Follow-up laboratorial	Recém-nascidos Assintomáticos												Recém-nascidos Sintomáticos							
	Caso nº 1 Data de nascimento: 18/05/02				Caso nº 2 Data de nascimento: 21/05/02				Caso nº 4 Data de nascimento: 10/06/02				Caso nº 3 Data de nascimento: 26/05/02				Caso nº 5 Data de nascimento: 03/07/02			
Casos	Isol. viral	PCR	IgG	IgM	Isol. viral	PCR	IgG	IgM	Isol. viral	PCR	IgG	IgM	Isol. viral	PCR	IgG	IgM	Isol. viral	PCR	IgG	IgM
Nascimento	P	N	P	N	P	n.d.	n.d.	n.d.	P	N	P	N	P	N	P	P 38,52, 150	P	N	P	P 38,52, 150
Após 15 dias - 1mês	N		P	N	P		P	N	P		P	N	n.d.		P	P 38,52	P	N	P	Ind. 52
Após 2 meses	N		P	N	n.e.		n.e.	n.e.	n.e.		n.e.	n.e.	N		n.d.	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.
Após 3 meses	n.e.		n.e	n.e.	P		P	N	P		P	N	N		n.d.	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.
Após 5 meses	N		P	N	n.e.		n.e	n.e.	n.e.		n.e	n.e.	n.e.		n.e	n.e.	n.d.		n.d.	n.d.
Após 6 meses	P		P	N	N		P	N	n.e.		n.e	n.e.	P		n.d.	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.
Mães			P	N			P	N			P	N			P	P			P	N

n.d.= não disponível; n.e.= não efectuado; P= Resultado positivo; N= Resultado negativo; Ind.= Resultado indeterminado; 38, 52, 150 = proteínas recombinantes do VCM; Isol. viral = Isolamento viral.

Após adição do meio de manutenção os tubos incubam durante 48 horas. Após este período, as lamelas são fixadas, retiradas dos tubos e colocadas em lâmina. A infecção pelo VCM é detectada pela técnica de imunofluorescência indirecta, utilizando anticorpos monoclonais específicos para os antigénios precoces (EA) (MW=50,000) e precoces imediatos (IEA) (MW=72,000), segundo as instruções do fabricante (CMV Culture Identification Test, Trinity Biotech plc, Co. Wicklow, Irlanda).

Detecção do ADN

A técnica de PCR efectuou-se no sangue do cordão dos 653 casos disponíveis. Nas urinas em que o isolamento viral foi positivo também foi efectuada a técnica de PCR.

Os produtos foram processados utilizando um kit comercial cujo ensaio se baseia em 3 passos principais, nomeadamente a extracção do ADN viral das amostras, a amplificação genómica e a visualização com sondas específicas por hibridação em microplaca, utilizando oligonucleótidos específicos para o VCM (Herplex, Genómica, Coslada, Madrid, Espanha).

A extracção do ADN viral foi efectuada em 50 ml de cada produto (urina e soro). Utilizou-se também um controlo interno positivo, indicando a sua presença que ocorreu amplificação do ADN e assegurando que os resultados negativos são verdadeiros negativos.

Detecção de anticorpos

Nos recém-nascidos infectados foram realizados testes serológicos nos sangues do cordão disponíveis e nos soros, de forma periódica.

As amostras de soro foram testadas para a detecção de anticorpos da classe G e da classe M anti-VCM, por técnicas comerciais de imunofluorescência indirecta (Merifluor CMV IgG/IgM , Gull, Cincinnati, Ohio, EUA) e/ou imunoenzimática - técnica ELFA (VIDAS CMV IgG/IgM, bioMérieux sa, Marcy l'Etoile, França), segundo as instruções do fabricante.

Os produtos positivos para IgM foram confirmados por imunoblot, utilizando um teste comercial para detecção das proteínas p38, p52 e p150 (CMV IgM Blot 3.0, Genelabs Diagnostics Pte Ltd., Singapura).

Às mães dos recém-nascidos infectados congenitamente foi também efectuada a detecção serológica de IgG e de IgM, após terem sido informadas do resultado laboratorial positivo dos seus filhos.

RESULTADOS

A infecção congénita pelo VCM foi diagnosticada quer por cultura viral, quer pela técnica de PCR, em 5 dos 757 casos estudados. A proporção de transmissão intrauterina foi de 0,7%. Não foi detectado genoma do VCM nos 653 sangues do cordão analisados.

Os 5 recém-nascidos nasceram assintomáticos. Em 2 casos foram detectados sinais/sintomas de doença, durante o

primeiro mês de vida: pneumonia e vasculite dos núcleos da base (1 caso); pancitopénia, aplasia medular, hepatite e vasculite dos núcleos da base (1 caso). A proporção de recém-nascidos com sintomatologia durante o primeiro mês de vida foi de 2/5 (40%).

Os resultados dos testes periódicos realizados para cada um dos recém-nascidos infectados congenitamente estão expressos no quadro 1, bem como os resultados no que respeita ao status serológico das mães dos 5 filhos com infecção congénita pelo VCM.

As 2 crianças com sintomatologia no primeiro mês de vida apresentaram resultados positivos para a IgG e resultados positivo e indeterminado, respectivamente, para a IgM na colheita de sangue do cordão e na colheita efectuada no primeiro mês de vida. No que respeita às mães, estas foram convocadas para colheita de sangue após o resultado do diagnóstico laboratorial de infecção congénita, tendo sido a determinação de IgM negativa para 4 casos e positiva para um dos casos em que a criança era sintomática.

Quatro mães são de raça negra e apenas uma é caucasóide (4/5). A mãe do caso 2 é seropositiva para o VIH2. O recém-nascido foi tratado com zidovudina nas primeiras 6 semanas de vida. Até aos 6 meses de vida foi detectada a presença de anticorpos para o VIH2; após este período registou-se a ausência de anticorpos para o VIH2, sendo a pesquisa do antigénio p24 e a técnica de PCR negativas.

Aos 6 meses de vida as 5 crianças infectadas apresentaram um desenvolvimento do estado ponderal normal assim como a avaliação neurológica e oftalmológica. Laboratorialmente verificou-se que o caso 3 apresentasse uma linfocitose relativa com as transaminases ligeiramente alteradas para o grupo etário e o caso 5 linfocitose relativa com neutropenia.

COMENTÁRIOS

Não existe conhecimento prévio acerca da proporção de infecções congénitas causadas pelo VCM neste hospital nem no nosso país. No estudo efectuado, a proporção de infecções congénitas causadas pelo VCM foi de 0.7% e a proporção de recém-nascidos com infecção congénita e com sintomatologia durante o primeiro mês de vida foi de 2/5 (40%). Analisando os resultados obtidos, a proporção de infecção congénita, está de acordo com a descrita na literatura (2,3,).

Não foi detectado genoma viral pela técnica de PCR no sangue do cordão; esta técnica poderá não ser a técnica apropriada para detecção de infecção congénita, uma vez que o período virémico pode já não estar em curso.

O isolamento do VCM na urina do recém-nascido por shell-vial mostrou ser a técnica indicada para o diagnóstico de infecção congénita por este vírus uma vez que são encontrados resultados positivos sem evidência clínica ou patológica de infecção congénita na criança.

No que respeita aos resultados da serologia nas crianças pode inferir-se que o diagnóstico de infecção congénita baseado apenas nos resultados da colheita de sangue do cordão não é suficiente uma vez que a IgM pode não ser detectada na altura da colheita. O facto de apenas uma mãe ter um resultado de IgM positiva na colheita realizada após o nascimento da criança e as restantes serem negativas, não nos permite tirar conclusões acerca do período de infecção materno pois as imunoglobulinas da classe M podem ser detectadas por um período variável de tempo, variando de indivíduo para indivíduo.

Embora aos 6 meses de idade a avaliação do desenvolvimento das crianças infectadas mas assintomáticas seja normal, é prudente um longo período de follow-up, uma vez que estas poderão vir a desenvolver sequelas neurológicas a longo prazo. As crianças infectadas sintomáticas e assintomáticas irão ser seguidas clínica e laboratorialmente até aos 36 meses de vida.

O diagnóstico da infecção pelo VCM nos recém-nascidos é importante, quer ao nível epidemiológico, quer pela importância em identificar as crianças infectadas sem sintomatologia, pois permite que estas crianças sejam incluídas num programa de follow-up por forma a detectar e prevenir alguns problemas de desenvolvimento (4).

A importância da detecção de infecção fetal pelo VCM ainda é controversa, no entanto, achamos que o diagnóstico precoce poderá proporcionar uma intervenção clínica mais rápida (2,4,7).

PATROCÍNIOS

Este projecto (POCTI/ESP/43311/2001) foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia.

CORRESPONDÊNCIA

Sílvia Lopo
Unidade de Herpesvírus/Rubéola.
Centro de Virologia.
Instituto Nacional de Saúde
Dr. Ricardo Jorge
Avenida Padre Cruz
1649-016 Lisboa
Tel.: +351-21-7519206
Fax: +351-21-7526400
E-mail: uherpes.cvir@insa.min-saude.pt

BIBLIOGRAFIA

1 - National Center for Infectious Diseases. Cytomegalovirus Infection. [serial on line cited 2000 Jul 25]. Available from: http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/cmv.htm

2 - Lazzarotto T, Guerra B, Spezzacatena P, Varani S, Gabrielli L, Landini MP, et al. Prenatal Diagnosis of Congenital Cytomegalovirus Infection. J Clin Microbiol 1998;36:3540-44.

3 - Maine G, Lazzarotto T, Landini MP. New Developments in the diagnosis of maternal and Congenital CMV infection. Expert Rev Mol Diagn 2001;1(1):19-29.

4 - Lazzarotto T, Varani S, Spezzacatena P, Gabrielli L, Pradelli P, Landini MP, et al. Maternal IgG Avidity and IgM Detected by Blot as Diagnostic Tools to Identify Pregnant Women at Risk of Transmiting Cytomegalovirus. Viral Immunol 2000;13:137-41.

5 - Stagno S, Pass RF, Dworsky ME, Henderson RE, Moore EG, Alford CA, et al. Congenital cytomegalovirus infection: the relative importance of primary and recurrent maternal infection. N Engl J Med 1982;306:945-49.

6 - Peckham CS, Chin KS, Coleman JC, Henderson K, Hurley R, Preece PM. Cytomegalovirus infection in pregnancy: preliminary findings from a prospective study. Lancet 1983;18:1352-55.

7 - Whitley RJ, Kimberlin DW. Treatment of viral infections during pregnancy and the neonatal period. Clin Perinatol 1997;24:267-83.



Optimização de um Protocolo de Reacção em Cadeia da Polimerase para o Diagnóstico de Infecção por Vírus do Sarampo

M. Gíria, H. Rebelo de Andrade

Unidade de Vírus Respiratórios e Entéricos
Instituo Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge - Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa | Tel. 217 526 455 | e-mail: hsrebelo.andrade@insa.min-saude.pt

RESUMO

Foram testados três protocolos experimentais para a detecção e amplificação, por reacção em cadeia da polimerase, de fragmentos dos segmentos codificantes para as proteínas Hemaglutinina (H), Nucleocápside (N) e Matriz (M), do genoma do vírus do sarampo estirpe Loss. O protocolo testado para detecção e amplificação de fragmentos dos três segmentos simultaneamente, foi seleccionado como apresentando maior sensibilidade na detecção, e permitindo a obtenção de maior diversidade de informação genómica para caracterização filogenética de vírus. Com excepção da temperatura de annealing, optimizada para 50ºC na reacção de nested-PCR, todos os componentes dos meios reaccionais e ciclos de incubação para as reacções de PCR e nested-PCR, foram mantidos de acordo com o descrito no protocolo inicialmente testado. A sua aplicação permitiu a amplificação dos fragmentos desejados em quantidade suficiente para a sua sequenciação, directamente do RNA viral extraído.

ABSTRACT

Three experimental protocols were tested for the detection and amplification, by the Polymerase Chain Reaction, of genomic fragments from the segments coding for the Heamagglutinin (H), the Nucleocapsid (N) and the Matrix (M) proteins of the measles virus Loss strain genome. The protocol tested for the simultaneous detection and amplification of genomic fragments from the three segments, was selected for presenting the highest sensitivity in detection, and for providing more diverse genomic information for the filogenetic characterization of the virus. Except for the annealing temperature, optimized for 50ºC for the nested-PCR reaction, al reaction mix components and incubation cycles for the PCR and nested-PCR reactions, were maintained according to those described in the initially tested protocol. This permitted the amplification of the desired fragments, in sufficient amount for sequencing directly from the extracted viral RNA.

INTRODUÇÃO

Os casos notificados de infecção por vírus do sarampo, a nível mundial, sofreram um decréscimo acentuado com o desenvolvimento e introdução da vacinação, nos anos sessenta. No entanto, o sarampo permanece ainda responsável por cerca de 900 mil mortes anuais, num total de 30 milhões de novos casos, constituindo a mais mortal doença de infância prevenível por vacinação[1,2,3,4]. Está actualmente implementado um Plano Estratégico Global com vista ao controlo e eliminação da transmissão do vírus do sarampo, desenvolvido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em cooperação com o Centro de Prevenção e Controlo de Doenças dos Estados Unidos (CDC), Organização de Saúde Pan-Americana (PAHO) e Organização de Fundos para Crianças das Nações Unidas (UNICEF)[1,2,3,4]. O plano prevê: (1) uma fase de controlo da doença, por redução da sua incidência e mortalidade através da vacinação; (2) uma fase de prevenção de surtos, por implementação de sistemas de vigilância que incluam o diagnóstico rápido da infecção e a condução de estudos epidemiológicos e; (3) uma fase de eliminação da transmissão do vírus. O sucesso, à data, dos seus objectivos específicos poderá conduzir à tentativa de erradicação mundial do sarampo[1,2,3,4].

Este trabalho experimental teve como objectivo a optimização de um protocolo de Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR) para o diagnóstico de infecção por vírus do sarampo, passível de ser adoptado como método de diagnóstico laboratorial inserido no sistema de vigilância e permitindo a condução de estudos epidemiológicos da doença.

MATERIAIS E MÉTODOS

Constituição de pool do vírus do sarampo

Foi constituída uma pool de vírus do sarampo de título 10 3,5 TCID50 /50ml inoculo, por inoculação de uma estirpe de referência Loss em células Vero.

Extracção de RNA viral

O RNA viral foi extraído segundo o método de Boom et al5, alterado, utilizando partículas de sílica. A 150ml de amostra foram adicionados 750ml de tampão de lise (L6) tiocianato de guanidina (GuSCN). A mistura foi agitada 5 segundos no vortex, após o que lhe foram adicionados 40ml de solução de sílica (Sigma) e de novo agitada 5 segundos no vortex.

Após 10 minutos à temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada (Eppendorf 5417C) a 18000xg durante 35segundos. O pellet resultante foi lavado duas vezes com tampão de lavagem contendo GuSCN (L2), duas vezes com etanol 70% (Merck) e uma vez com solução de acetona comercial (Merck). O pellet resultante foi seco a 56ºC (Techne Dri-block DB3) durante 10 minutos com tampa aberta, após o que o RNA foi eluído por resuspensão do pellet em 60ml de H2O sem nucleases (Promega) contendo 1ml de RNA-sin (Promega), permanecendo a mistura o.n. a 4ºC. A mistura foi agitada no vortex, incubada a 56ºC (Techne Dri-block DB3) durante 10 minutos, centrifugada (Eppendorf 5417C) a 20800xg durante 4 minutos e o sobrenadante recolhido. O pellet resultante foi, de novo, centrifugado (Eppendorf 5417C) a 20800xg durante 2 minutos, e o sobrenadante recolhido e adicionado ao anterior. A combinação dos sobrenadantes recolhidos foi utilizada directamente na síntese de cDNA.

Síntese de cDNA

40ml da solução de RNA extraído foram adicionados a 60ml de mistura contendo 10ml de tampão PCR 10x (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl) (Life Technologies), 3ml de MgCl2 (50mM) (Life Technologies), 2ml de dNTP (10mM) (Boehringer), 2ml M-MLV Rtase (200U/ml) (Life Technologies), 1ml de Random Hexamers (50U/2,5ml) (Amersham Pharmacia Biotech), 1ml RNAsin (40U/ml) (Promega) e 41ml H2O sem nucleases (Promega). A mistura de reacção foi incubada (BIORAD e-cycler) à temperatura ambiente durante 10 minutos, seguida de 37ºC durante 45 minutos, 95ºC durante 5 minutos e colocada em gelo durante 3 minutos. O cDNA sintetizado foi armazenado a -32ºC até à sua utilização na reacção de PCR.

Detecção e amplificação por PCR

Foram testados 3 protocolos para a reacção de PCR seguida de nested-PCR, diferindo na concentração dos componentes da mistura reaccional, tempos e temperaturas dos ciclos de incubação e no número de ciclos aplicados. Os mesmos pares de primers, para a amplificação do cDNA sintetizado, foram utilizados nos três protocolos, separadamente ou em conjunto, para a amplificação de fragmentos dos segmentos codificantes para as proteínas H (hemaglutinina), N (nucleocápside) e M (matriz) (Quadro I).

Protocolo 1 (protocolo não publicado)
Protocolo para amplificação de um fragmento do segmento H

A 20ml do produto de síntese de cDNA foram adicionados 30ml de mistura reaccional para reacção de PCR contendo 5ml tampão PCR 10x (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl) (Life Technologies), 1,5ml MgCl2 (50mM) (Life Technologies), 1ml cada primer Mh1, Mh2R (10 pmol/ml) (Cruachem), 0,4ml Taq polimerase (5U/ml) (Life Technologies), 1ml dNTPs (10mM) (Boehringer) e 20,1ml H2O sem nucleases (Promega). Os períodos de incubação (BIORAD e-cycler) aplicados foram de 95ºC durante 2 minutos, seguidos de 25 ciclos de 94ºC durante 1 minuto, 50ºC durante 4 minutos e 72ºC durante 1 minuto.

A 10ml do produto da reacção de PCR foram adicionados 40ml de mistura reaccional para reacção de nested-PCR contendo 5ml tampão PCR 10x (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl) (Life Technologies), 1,5ml MgCl2 (50mM) (Life Technologies), 1ml cada primer Mh3, Mh4R (25 pmol/ml) (Cruachem), 1,8ml Taq polimerase (5U/ml) (Life Technologies), 1ml dNTPs (10mM) (Boehringer) e 28,7ml H2O sem nucleases (Promega). Os períodos de incubação (BIORAD e-cycler) aplicados foram de 95ºC durante 2 minutos, seguidos de 25 ciclos de 94ºC durante 1 minuto, 55ºC durante 1 minuto e 72ºC durante 1 minuto.

O produto da reacção de nested-PCR foi detectado por electroforese em gel de Agarose (GTGSeakem) 2% em TBE 1x (Promega), com marcador 1Kb DNA (Life Technologies).

Protocolo 2 (protocolo não publicado)
Protocolo para amplificação de fragmentos dos segmentos H e N

A 20ml do produto de síntese de cDNA foram adicionados 30ml de mistura reaccional para reacção de PCR, preparada para um volume final de 40ml contendo 5ml tampão PCR 10x (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl) (Life Technologies), 1,5ml MgCl2 (50mM) (Life Technologies), 1ml cada primer Mh1, Mh2R, Mn1, Mn2R (10 pmol/ml) (Cruachem), 0,125ml Taq polimerase (5U/ml) (Life Technologies), 1ml dNTPs (10mM) (Boehringer) e 28,375ml H2O sem nucleases (Promega). Os períodos de incubação (BIORAD e-cycler) aplicados foram de 95ºC durante 2 minutos, seguidos de 25 ciclos de 95ºC durante 1minuto, 50ºC durante 2 minutos e 65ºC durante 3 minutos.

A 10ml do produto da reacção de PCR foram adicionados 40ml de mistura reaccional para reacção de nested-PCR contendo 5ml tampão PCR 10x (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl) (Life Technologies), 1,5ml MgCl2 (50mM) (Life Technologies), 1ml cada primer Mh3, Mh4R, Mn3, Mn4R (25 pmol/ml) (Cruachem), 0,125ml Taq polimerase (5U/ml) (Life Technologies), 1ml dNTPs (10mM) (Boehringer) e 28,375ml H2O sem nucleases (Promega). Os períodos de incubação (BIORAD e-cycler) aplicados foram de 95ºC durante 2 minutos, seguidos de 25 ciclos de 95ºC durante 1 minuto, 50ºC durante 2 minutos e 65ºC durante 3 minutos.

O produto da reacção de nested-PCR foi detectado por electroforese em gel de Agarose (GTGSeakem) 2% em TBE 1x (Promega), com marcador 1Kb DNA (Life Technologies).

Protocolo 3
Protocolo para amplificação de fragmentos dos segmentos H, N e M[7,8,9]

A 20ml do produto de síntese de cDNA foram adicionados 30ml de mistura reaccional para reacção de PCR contendo 3ml tampão PCR 10x (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl) (Life Technologies), 0,9ml MgCl2 (50mM) (Life Technologies), 1ml cada primer Mh1, Mh2R, Mn1, Mn2R, Mm1, Mm2R (5 pmol/ml) (Cruachem), 0,2ml Taq polimerase (5U/ml) (Life Technologies), e 19,9ml H2O sem nucleases (Promega). Os períodos de incubação (BIORAD e-cycler) aplicados foram de 95ºC durante 2 minutos, seguidos de 25 ciclos

de 94ºC durante 1minuto, 50ºC durante 1 minuto e 72ºC durante 1 minuto.
A 3ml do produto da reacção de PCR foram adicionados 47ml de mistura reaccional para reacção de nested-PCR contendo 5ml tampão PCR 10x (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl) (Life Technologies), 1,5ml MgCl2 (50mM) (Life Technologies), 1ml cada primer Mh3, Mh4R, Mn3, Mn4R, Mm3, Mm4R (25 pmol/ml) (Cruachem), 0,2ml Taq polimerase (5U/ml) (Life Technologies), 1ml dNTPs (10mM) (Boehringer) e 33,3ml H2O sem nucleases (Promega). Os períodos de incubação (BIORAD e-cycler) aplicados foram de 95ºC durante 2 minutos, seguidos de 25 ciclos de 94ºC durante 1minuto, 55ºC durante 1 minuto e 72ºC durante 1 minuto.
O produto da reacção de nested-PCR foi detectado por electroforese em gel de Agarose (GTGSeakem) 3% em TAE 1x (Life Technologies), com marcador 1Kb DNA (Life Technologies).

Purificação do produto da reacção de nested-PCR

Os fragmentos de DNA foram cortados do gel de agarose e purificados utilizando o kit QIAGENII (QIAGEN), de acordo com as instruções do fornecedor.
Sequenciação do produto da reacção de nested-PCR
Os fragmentos genómicos purificados foram sequenciados (ABIPrism 377 DNA Sequencer; ABIPrism 3100 Genetic Analyser) utilizando o Kit Big Dye-Terminator Applied Biosystems), por utilização individual dos primers descritos para a reacção de nested-PCR.

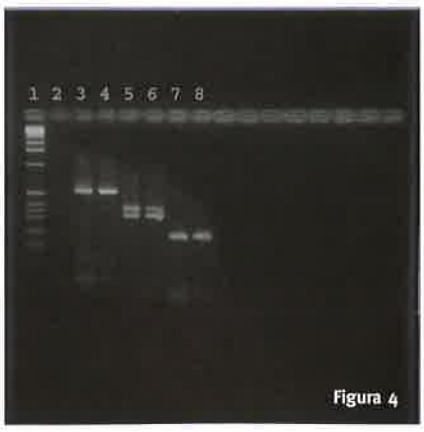


Figura 4

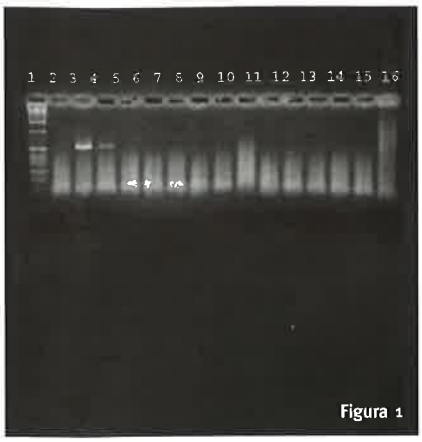


Figura 1

RESULTADOS

Sensibilidade dos protocolos de PCR testados

A sensibilidade na detecção do genoma do vírus do sarampo presente em células infectadas é de elevada importância, essencialmente na aplicação da reacção de PCR ao diagnóstico, de forma a garantir a obtenção de resultados seguros e fiáveis em presença de reduzidas concentrações de genoma viral em amostras biológicas[7].
A sensibilidade dos protocolos utilizados foi avaliada pela ocorrência de amplificação de fragmentos genómicos do vírus do sarampo, em diluições seriadas da pool utilizada.
A aplicação do protocolo-1 permitiu a detecção e amplificação do fragmento de 552pb do segmento H até a um limite de 316 TCID50 (Figura 1).
A aplicação do protocolo-2 permitiu a detecção e amplificação dos fragmentos de 552pb e 317pb dos segmento H e N, respectivamente, até um limite de 316 TCID50. A presença da banda 3 reflectiu a amplificação não-específica de um fragmento de aproximadamente 357pb do genoma viral (Figura 2).
A aplicação do protocolo-3 permitiu a detecção e amplificação do fragmento de 187pb do segmento M até um limite de 0,316 TCID50, e dos fragmentos de 552pb e 317pb dos segmentos H e N, respectivamente, até um limite de 31,6 TCID50, tendo sido este protocolo seleccionado como apresentando maior sensibilidade na detecção de genoma viral. A presença da banda 4 reflectiu, novamente, a amplificação não específica do fragmento de cerca de 357pb do genoma viral (Figura 3).



Figura 2

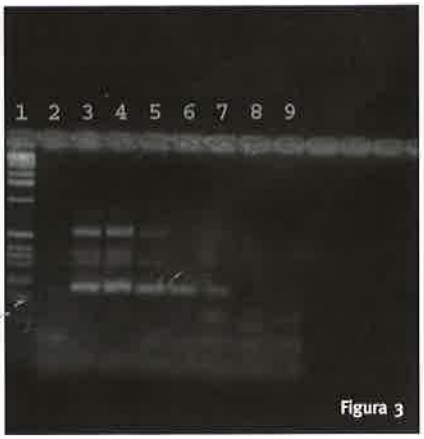


Figura 3

Confirmação do segmento para o qual ocorre amplificação não-específica de um fragmento

A aplicação do protocolo-3, por adição individual dos primers para amplificação dos três fragmentos permitiu a confirmação do fragmento de 357pb de amplificação não-específica como pertencente ao segmento N do genoma viral (Figura 4).

Optimização de parâmetros do protocolo-3: tentativa de eliminação da amplificação não-específica

Foram conduzidas reacções de PCR e nested-PCR com aplicação de uma gama de temperaturas de annealing de 45 - 60ºC, na tentativa da sua optimização. Esta reflectiu a tentativa de eliminação da amplificação do produto não-específico e, de obtenção de uma maior quantidade de produto específico amplificado

individualmente pelos três pares de primers utilizados. Foram aplicadas as temperaturas de annealing de 50ºC e 60ºC a misturas reaccionais preparadas de acordo com o protocolo-3, relativamente à reacção de PCR, mantendo os restantes parâmetros da reacção de PCR e nested-PCR de acordo com os estabelecidos no protocolo utilizado. O resultado da variação da temperatura de annealing na reacção de PCR não revelou qualquer alteração relativamente ao obtido por aplicação da temperatura de annealing 50ºC estabelecida no protocolo-3 utilizado, pelo que o seu valor foi mantido inalterado (resultado não apresentado).

Foram aplicadas as temperaturas de annealing de 45ºC, 50ºC, 55ºC e 60ºC ao meio reaccional preparado de acordo com o protocolo-3 relativamente à reacção de nested-PCR, mantendo os restantes parâmetros da reacção de nested-PCR e PCR de acordo com os estabelecidos no protocolo utilizado, não tendo sido possível a eliminação da amplificação não-específica. Relativamente à quantidade de produto final amplificado, a aplicação de uma temperatura de annealing de 50ºC confere claramente um maior rendimento à reacção, sendo alterada para este valor a temperatura de annealing a aplicar na reacção de nested-PCR pelo protocolo-3 descrito (Figura 5).



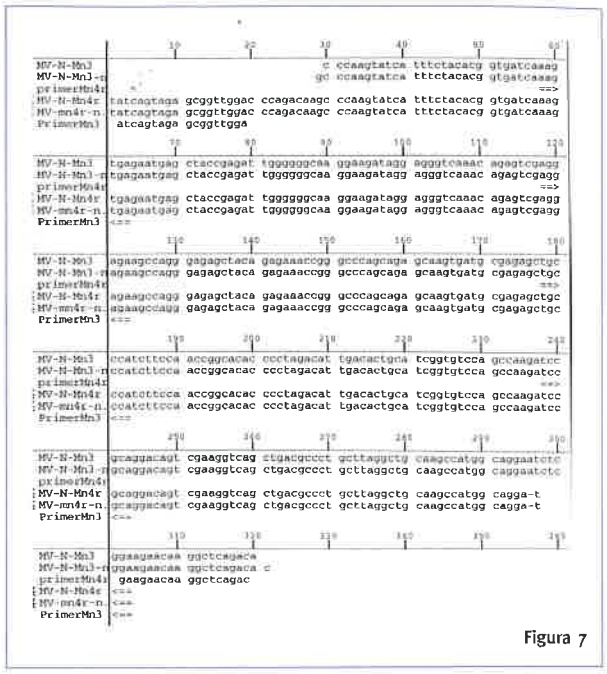
Figura 5



Figura 6

Foi conduzida uma reacção de PCR e nested-PCR de acordo com o protocolo-3 alterado, para a optimização da concentração dos primers utilizados para amplificação do fragmento do segmento N, na tentativa de eliminar ou minimizar a amplificação de produto não-específico e de maximizar o seu rendimento em produto final. O efeito da redução na concentração dos primers foi testado conjuntamente para a reacção de PCR e nested-PCR, de acordo com o procedimento indicado no quadro II.

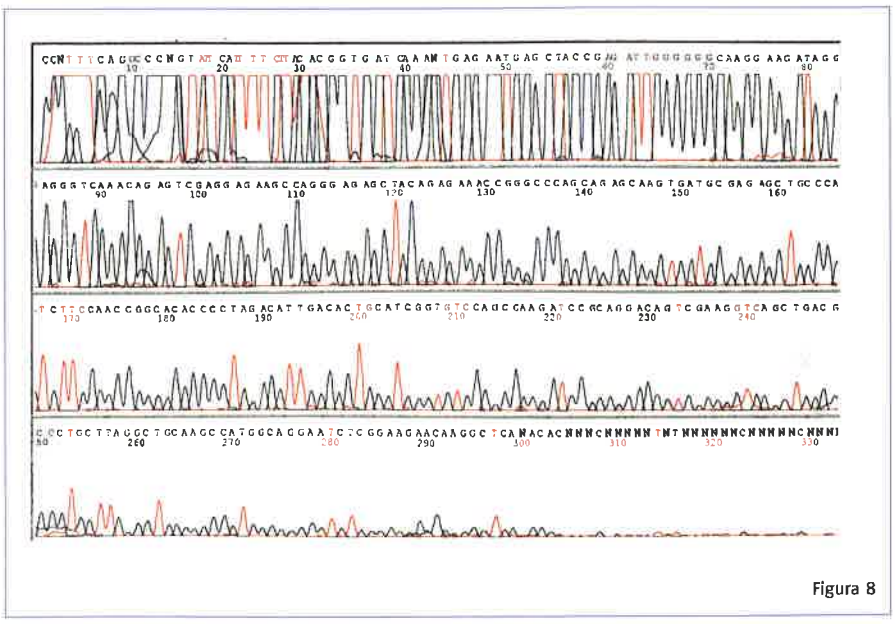
A redução na concentração dos primers no meio reaccional da reacção de PCR e nested-PCR, individualmente ou em conjunto, não teve, aparentemente, qualquer efeito na tentativa de eliminação da formação de produto não-específico ou no rendimento em produto final amplificado, sendo as sua concentrações inicialmente descritas mantidas inalteradas (Figura 6).


Figura 7

Determinação da origem da amplificação não-específica do fragmento do segmento N

O alinhamento entre a sequência de bases dos fragmentos amplificados específica e não-especificamente do segmento N revelou tratar-se da mesma sequência (Figura 7).

O electroferograma obtido por sequenciação do fragmento de amplificação não-específica do segmento N, utilizando o primer Mn3, permitiu verificar a existência de uma continuação na leitura de ba-


Figura 8

ses após o local de annealing específico do primer Mn4R (Figura 8).
O alinhamento entre a sequência de bases do fragmento de amplificação não-específica do segmento N, o primer Mn4R e a sequência do segmento N da estirpe Edmonston utilizada como referência no desenho dos primers, permitiu detectar nesta uma região com algum nível de homologia com a sequência de bases do primer Mn4R, a 3´ do seu local de annealing específico (Figura 9).

DISCUSSÃO

A importância da aplicação prática de um protocolo de PCR para diagnóstico de infecção por vírus do sarampo, possibilitando o seu estudo genómico directamente de amostras biológicas, é conferida pela selecção de segmentos a amplificar e pela sensibilidade e especificidade da sua detecção.
A avaliação comparativa dos três protocolos testados permitiu a selecção do protocolo 3 para optimização e implementação como metodologia de referência, com base na selecção de segmentos a amplificar (segmentos H, N e M) e sensibilidade na sua detecção. A amplificação do segmento H do genoma viral, codificante para a proteína hemaglutinina, é de extrema importância na análise genómica por esta constituir o alvo maioritário de reconhecimento por anticorpos. O segmento N, codificante para a proteína nucleocápside, apresenta o maior nível de variabilidade do genoma, sendo a sua análise genómica de elevada importância na caracterização filogenética dos vírus isolados e o segmento M, codificante para a proteína matriz, é altamente conservado comparativamente com os restantes segmentos genómicos conferindo um elevado nível de segurança ao diagnóstico[7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22]. Esta amplificação simultânea garante a obtenção de um conjunto de informação que permite um estudo genómico mais completo e aprofundado e ainda uma elevada especificidade na detecção do genoma viral que, embora não avaliada neste trabalho experimental, se encontra bem documentada[19].

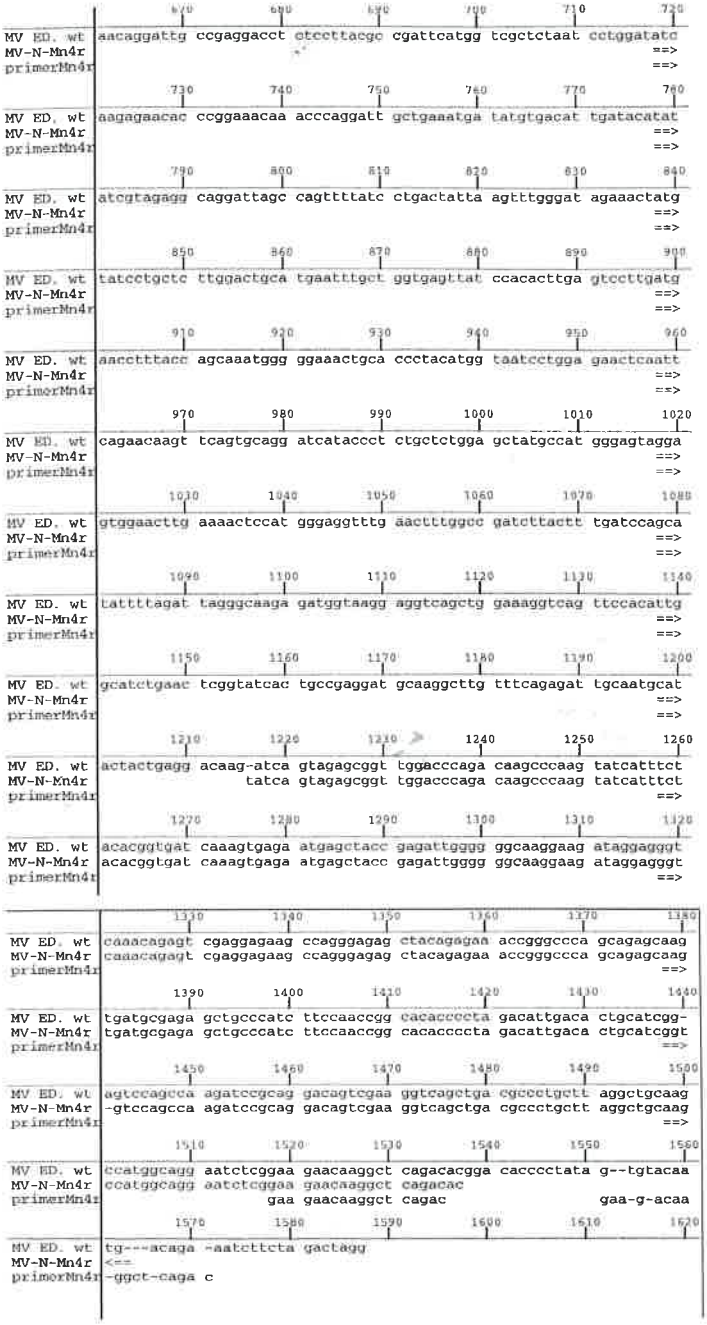


Figura 9

Relativamente à sensibilidade na detecção de genoma viral, a comparação entre os resultados obtidos pelos três protocolos utilizados para a amplificação do segmento H e protocolos 2 e 3 para a amplificação do segmento N, permite seleccionar o protocolo 3 como sendo igualmente o mais sensível.
Este foi, consequentemente, testado e analisado de forma a garantir a sua optimização e funcionalidade como metodologia de referência no diagnóstico e análise genómica viral. A análise dos resultados obtidos pela sua aplicação permitiu verificar a ocorrência de uma sensibilidade mais elevada na detecção e amplificação do segmento M, comparativamente com os restantes segmentos amplificados. Esta discrepância pode dever-se ao facto de este constituir a região mais conservada do genoma viral, podendo, como tal, ser reconhecido pelos

primers utilizados mesmo em presença de estirpes filogeneticamente afastadas e consequentemente apresentando diferenças ao nível da sua sequência de bases (como a estirpe Edmonston utilizada como referência no desenho dos primers e a estirpe Loss utilizada como controlo positivo para testar a aplicação do protocolo). A localização do segmento M próxima do terminal 5´ do genoma viral pode igualmente contribuir para esta ocorrência, uma vez que a transcrição ocorre segundo um gradiente de 5´ para 3´, resultando numa maior acumulação de RNA viral dos segmentos localizados próximo do terminal 5´[11].

Por aplicação do protocolo 3, verifica-se, no entanto, a amplificação de um fragmento não-específico do segmento N. Esta não terá qualquer efeito na capacidade de diagnóstico de infecção por vírus do sarampo, por ser igualmente indicadora da presença de genoma viral, embora o rendimento de amplificação do produto específico do segmento N sofra uma redução por ocorrer competição pelo annealing dos primers disponíveis no meio reaccional. A obtenção de uma menor quantidade de produto específico amplificado reflecte, consequentemente, uma menor disponibilidade de produto para sequenciação e caracterização filogenética obtido directamente das reacções de amplificação. Este factor não se apresentou, no entanto, limitativo à aplicação do protocolo 3 com vista à análise genómica viral, tendo sido obtido produto amplificado, após purificação, em quantidade suficiente à condução da reacção de sequenciação dos fragmentos desejados, directamente do RNA viral extraído.

A análise do alinhamento entre o fragmento de amplificação específica, a estirpe de referência Edmonston e o primer Mn4R, permitem sugerir que a formação de produto não-específico ocorra por annealing não-específico do primer Mn4R a um local a 3´do seu local de annealing específico. O fragmento amplificado não-especificamente seria 33 bases superior em tamanho relativamente ao fragmento de amplificação específica, encontrando-se este valor muito aproximado ao obtido por determinação do seu tamanho em pb directamente de fotografias de gel de agarose obtidas (resultado não apresentado). Não tendo sido possível a sua eliminação por optimização da temperatura de annealing e concentração de primers a aplicar, parâmetros condicionantes da sua ocorrência, sugere-se o desenho de novos primers, complementares a regiões únicas do genoma viral, para amplificação de um diferente fragmento do segmento N.

Pode concluir-se que o protocolo 3 permitiu a detecção e amplificação de fragmentos do genoma viral com elevada sensibilidade, tendo ainda sido obtido produto amplificado em quantidade necessária à sua análise genómica. A utilização do protocolo 3 como metodologia de referência no diagnóstico de infecção por vírus do sarampo pode, consequentemente, ser inserida no sistema de vigilância implementado na fase de prevenção de surtos, referida anteriormente e prevista pelo Plano Estratégico Global com vista à eliminação da transmissão do vírus. Deve, no entanto, ser garantida a disponibilidade de amostras biológicas, de acordo com a sua natureza e período de colheita específicos, de pacientes com suspeita de infecção por vírus do sarampo de forma a garantir a fiabilidade do diagnóstico baseado em pesquisa de genoma viral.

Quadro I
Descrição das características dos primers utilizados pelos protocolos de PCR testados

Primer[a]	Sentido	Posição[b] (nt)	Sequência (5´-3´)	Produto Amplificado	Temp. Melting[c]	Temp. Annealing[d]
Gene Hemaglutinina						
Mh1	(+)	7844-7864	ACTACAATCAGAGGTCAATTC	570	58ºC	53-55ºC
Mh2R	(-)	8394-8414	AGCATGTCTCCATTCGCAACT		62ºC	57-59ºC
Mh3	(+)	7852-7871	CAGAGGTCAATTCTCAAACA	552	56ºC	51-53ºC
Mh4R	(-)	8385-8404	CATTCGCAACTTGTCATCTG		58ºC	53-55ºC
Gene Nucleocápside						
Mn1	(+)	1304-1323	TGCATACTACTGAGGACAA	390	54ºC	49-51ºC
Mn2R	(-)	1694-1676	TCTCGCACCTAGTCTAGAA		56ºC	51-53ºC
Mn3	(+	1324-1341	ATCAGTAGAGCGGTTGGA	317	54ºC	49-51ºC
Mn4R	(-)	1641-1624	GTCTGAGCCTTGTTCTTC		54ºC	49-51ºC
Gene Matriz						
Mm1	(+)	3541-3560	TCAGAGTCATAGATCCTGGT	200	58ºC	53-55ºC
Mm2R	(-)	3740-3721	AACAACTATGTCAAGCTCAG		56ºC	51-53ºC
Mm3	(+)	3549-3560	ATAGATCCTGGTCTAGGC	187	54ºC	49-51ºC
Mm4R	(-)	3736-3719	ACTATGTCATGCTCAGTG		52ºC	47-49ºC

(a)Os primers Mh3, Mh4R, Mn3, Mn4R, Mm3 e Mm4R (Cruachem) foram igualmente utilizados nas reacções de sequenciação.
(b)A posição (nt) é referente à estirpe de Edmonston (GeneBank, numero de acesso 16565)
(c)(d)A temperatura de melting dos primers foi determinada com base na fórmula Tm = (A+T) x 2ºC + (G+C) x 4ºC. A temperatura de annealing foi considerada 3-5ºC abaixo da temperatura de melting determinada 6.

Quadro II
Concentração de primers a utilizar nas reacções de amplificação do protocolo-3s

Tubo	A	B
1	5	25
2	5	15
3	3	25
4	3	15

A ~ Concentração final de primers adicionados à mistura reaccional para a reacção de PCR. (pmol/ml)

B ~ Concentração final de primers adicionados à mistura reaccional para a reacção de nested-PCR. (pmol/ml)

LEGENDAS

Legenda da figura 1:
poço 1: marcador (1kb DNA); poço 2: controlo negativo (meio de células); poço 3: pool de vírus do sarampo; poço 4 - 16: diluições seriadas de 10-1 a 10-13 da pool de vírus do sarampo. A banda visível corresponde ao amplicão de 552pb, do gene H.

Legenda da figura 2
poço 1: controlo negativo (meio de células); poço 2: pool de vírus do sarampo; poço 3 - 10: diluições seriadas de 10-1 a 10-8 da pool de vírus do sarampo; poço 11: marcador (1kb DNA). As bandas visíveis correspondem, no sentido dos poços à base do gel, ao amplicão de 552pb do gene H, com reduzida nitidez à amplificação não-específica de um fragmento do genoma viral e ao amplicão de 317pb do gene N, respectivamente.

Legenda da figura 3
poço 1: marcador (1kb DNA); poço 2: controlo negativo (meio de células); poço 3: pool de vírus do sarampo; poço 4 - 9: diluições seriadas de 10-1 a 10-6 da pool de vírus do sarampo. As bandas visíveis correspondem, no sentido dos poços à base do gel, aos amplicões de 552pb do gene H, amplificação não-específica do um fragmento do genoma viral, amplicão de 317pb do gene N e de 187pb do gene M, respectivamente.

Legenda da figura 4
poço 1: marcador (1kb DNA); poço 2: controlo negativo (meio de células); poço 3, 4: meio reaccional contendo primers para amplificação do fragmento do segmento H; poço 5, 6: meio reaccional contendo primers para amplificação do fragmento do segmento N; poço 7, 8: meio reaccional contendo primers para amplificação do fragmento do segmento M. As bandas visíveis representam nos poços 3 e 4 o amplicão de 552pb do gene H, nos poços 5 e 6 a amplificação não-específica do fragmento de 357pb do genoma viral e amplicão de 317pb do gene N e nos poços 7 e 8 o amplicão de 187pb do gene M, respectivamente.

Legenda da figura 5
poço 1: marcador (1kb DNA); poço 2: controlo negativo (meio de células); poço 3 a 6: aplicação da temperatura de annealing de 45ºC, 50ºC, 55ºC e 60ºC, respectivamente, nos ciclos térmicos da reacção de nested-PCR. As bandas visíveis representam, no sentido dos poços à base do gel, o amplicão de 552pb do gene H, amplificação não-específica do fragmento de 357pb do genoma viral, amplicão de 317pb do gene N e de 187pb do gene M, respectivamente

Legenda da figura 6
poço 1: marcador (1kb DNA); poço 2: controlo negativo (meio de células); poço 3 a 6: produto da reacção de nested-PCR contido nos tubos 1 a 4, respectivamente. As bandas visíveis representam, no sentido dos poços à base do gel, o amplicão de 552pb do gene H, amplificação não-específica do fragmento de 357pb, amplicão de 317pb do gene N e de 187pb do gene M, respectivamente.

Legenda da figura 7
Alinhamento entre a sequência de bases dos fragmentos do segmento N amplificados especifica- e não-especificamente.

Legenda da figura 8
Electroferograma obtido por sequenciação do fragmento de amplificação não-específica do segmento N, utilizando o primer Mn3.

Legenda da figura 9
Alinhamento entre a sequência de bases do fragmento de amplificação não-específica do segmento N, a sequência de bases do segmento N da estirpe Edmonston e a sequência do primer Mn4R. A designação MV ED. Wt corresponde à sequência de bases do segmento N do genoma viral da estirpe de referência Edmonston, a designação MV-N-Mn4R corresponde à sequência de bases do segmento N da estirpe Loss obtida por utilização do primer Mn4R e a designação primer Mn4R corresponde à sequência de bases do primer Mn4R.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) Doc. Organização Mundial de Saúde (1998) - Measles.
(2) Doc. Organização Mundial de Saúde (1998) - Advances in Global Measles Control and Elimination : Summary of the 1997 International Meeting.
(3) Doc. Organização Mundial de Saúde (2001) - Press Release : U.N. launch new plan to halve mortality of measles, a major childhood killer.
(4) Doc. Organização Mundial de Saúde (1999) - WHO Guidelines for Epidemic Preparedness and Response to Measles Outbreaks.
(5) Boom, R; Sol, CJA; Salimans, MMM; Jansen, CL; Wertheim Van Dillen, PME; Van Der Noordaa, J - Rapid and simple method for purification of nucleic acids. Journal of Clinical Microbiology, 1990; Mar: 495-503.
(6) Newton, CR - PCR essential data. John Wiley and Sons.
(7) L, Jin; Richards, A; Brown, DWG - Development of a dual target PCR for detection and characterization of measles virus in clinical samples. Molecular and Cellular Probes, 1996; 10: 191-200.
(8) L, Jin; Sun, YJ; GE, L; Brown, DWG - Characterization of of a new genotype of measles virus in China and England. Epidemiol. Infect., 1998; 121: 691-697.
(9) L, Jin; Brown, DWG; Ramsey, MEB; Rota, PA; Bellini, WJ - The diversity of measles virus in the United Kingdom. Journal of General Virology, 1997; 78: 1287-1294.
(10) Norrby, AB; Oxman, MN - Measles Virus. Virology 2ª Ed. Raven Press New York. Cap 27.
(11) Orvel, C - Measles Virus. Encyclopaedia of Virology, 5ª Ed. Academic Press, Cap 22.
(12) Rota, PA; Bellini, JS - Molecular epidemiology of measles virus. Seminars in Virology, 1995. 6: 379-386.
(13) L., Jin; Knowles, WA; Rota, PA; Bellini, WJ; Brown, DWG - Genetic and antigenic characterization of the heamagglutinin protein of measles virus strains recently circulating in the UK. Virus Research, 1999; 55: 107-113.
(14) Chadwich, N; Bruce, I; Davies, M; Gemen, B; Schukkink, R; Khan, K; Pounder, R; Wakefield, A - A sensitive and robust method for measles RNA detection. Journal of Virological Methods, 1998; 70: 59-70.
(15) Vardas, E; Kreis, S - Isolation of measles virus from a naturally-immune asymptomatically re-infected individual. Journal of Clinical Virology, 1999; 13: 173-179.
(16) R., Ray; Cooper, PJ; Earl, P; Dhillon, AP; Pounder, RE; Wakefield, AJ - Direct in situ reverse transcriptase polymerase chain reaction for the detection of measles virus. Journal of Virological Methods, 1996; 60: 1-17.
(17) Birkun, A; Kuiken, T; Haines, DM; Osterhaus, ADME; Van de Bildt, MWG; Joiris, CR; Siebert, U - Epizootic of morbilliviral disease in common dolphins (Delphinus delphis ponticus) from the black sea. Veterinary Record, 1999; Jan: 85-92.
(18) Bilkis, MD; Barrero, PR; Mistchenko, AS - Measles Resurgence in Argentina: 1997-8 Outbreak. Epidemiol. Infect., 2000; 124: 289-293.
(19) Kawashima, H; Mori, T; Kashiwagi, Y; Takekuma, K; Hoshika, A; Wakefield, A - Detection and Sequencing of measles virus from peripheral mononuclear cells from patients with Inflammatory Bowel Disease and Autism. Digestive Disease and Science, 2000; 45,4: 723-729.
(20) Barrero, PR; Wolff, CD; Passeggi, CA; Mistchenko, AS - Sequence analysis of measles virus heamagglutinin isolated in Argentina during the 1997-1998 outbreak. Journal of Medical Virology, 2000; 60: 91-96.
(21) Mubarak, S; Van de Bildt, MWG; Mustafa, OA; Vos, HW; Mukhtar, MM; Groen, J; Hassan, AM; Niesters, HGM; Ibrahim, SA; Zijlstra, EE; Wild, TF; Osterhaus, ADME; Swart, RL - Serological and virological characterization of clinically diagnosed cases of measles in suburban Khartoum. Journal of Clinical Microbiology, 2000; Mar: 987-991.
(22) Shimizu, H; McCarthy, CA; Smaron, MF; Burns, JC - Polymerase chain reaction for the detection of measles virus in clinical samples. Journal of Clinical Microbiology, 1993; Maio: 1034-1039.

DSGN
Comunicação e Imagem



A sua Forma, a nossa Função!



Design Gráfico | Design Editorial | Imagem Corporativa | Gestão do Design
Eventos | Sinalética | Multimédia | Web Design | Gestão de Produção
DSGN | Campo Pequeno nº 50, 4º esq. 1000-081 LISBOA
T :: 217 981 065 F :: 217 981 068 e-mail :: dsgn@netcabo.pt

Sociedade Portuguesa de DOENÇAS INFECCIOSAS
Johnson&Johnson PRODUTOS PROFISSIONAIS
Gynecare
Hospitais SA
OLYMPUS
CENTRAL BUSINESS
GOURMET
VFR ENGENHARIA | CONSTRUÇÃO



RPDI

REVISTA PORTUGUESA DE DOENÇAS INFECCIOSAS

Para receber trimestralmente a **Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas,** destaque o cupão incluído em baixo, e envie-o devidamente preenchido para:

Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas
Av. Óscar Monteiro Torres, 16 R/c Esq.
1000-219 Lisboa

FICHA DE INSCRIÇÃO

Nome (Completo) _____

Endereço (Completo) _____

Localidade _____ **Código Postal** _____ - _____

Telefone _____ **Fax** _____ **E-mail** _____

Dados para facturação

Entidade/Nome _____

Morada _____

Localidade _____ **Código Postal** _____ - _____

NIF _____

Telefone _____ **Fax** _____ **E-mail** _____

Modalidade

Valor anual - 4 números (Janeiro, Abril, Julho e Outubro)

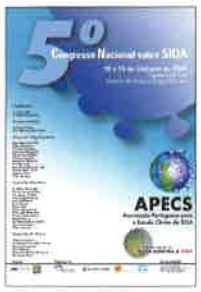
☐ Portugal 25€ ☐ Europa 35€ ☐ Restantes Países 45€

SIM, quero receber a Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas.
Junto envio Cheque ou vale Postal n.º _____ de ___ / ___ / _____ no valor de _____ €
sobre o Banco _____ à ordem da SPDI - Sociedade Portuguesa de Doenças Infecciosas.

Assinatura _____

2.º Encontro Nacional da Clínica de Ambulatório / Hospitais de Dia
24 e 25 de Setembro de 2004
Fundação Dr. António Cupertino de Miranda - Porto
Organização: Hospital São João (Porto)
Secretariado: Skyros Congressos
skyros@skyros-congressos.com
(T: 226165440 F: 226189539)

Infectious Disease Society of America 2004 Annual Meeting
September 30 - October 04, 2004
Boston, United States
Contact: Infectious Diseases Society of America, 66 Canal Center, Plaza, Suite 600, Alexandria, VA, 22314
Phone: 703-299-0200
E-Mail: info@idsociety.orgII



5.º Congresso Nacional Sobre SIDA
10 a 13 de Outubro de 2004
Centro de Artes e Espectáculos Figueira da Foz
Organização: APECS
Secretariado: Skyros Congressos
e-mail: sida2004@skyros-congressos.com
www.skyros-congressos.com

44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy
October 30 - November 02, 2004
Washington, United States
Contact: Conference Secretariat
Phone: 1-202-737-3600
E-Mail: ICAAC@asmusa.org

II Curso Pós-Graduado de Actualização em Infecção VIH/SIDA e Tuberculose
3 a 6 Novembro de 2004
Faculdade de Medicina de Lisboa - Auditório Morais David
Lisboa
Organização: Clínica Universitária de Doenças Infecciosas e Parasitárias
Secretariado: Gabinete de Formação Continua - Instituto de Formação Avançada
Faculdade de Medicina de Lisboa
Telef.: 217985144
e-mail: dora-ramos@fm.ul.pt
www.fmul.ifa.org

American Society of Tropical Medicine and Hygiene 53rd Annual Meeting
November 07 - November 11, 2004
Miami, United States
Contact: American Society of Tropical Medicine and Hygiene
Phone: 1-847-480-9592
Fax: 1-847-480-9282
E-Mail: astmh@astmh.org

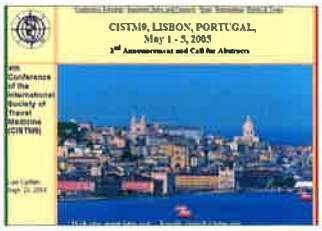
VII Reunião sobre Infecção VIH/SIDA "Terapêutica Antirretrocirica - Presente e Futuro"
27 de Novembro de 2004
Organização/Secretariado:
GlaxoSmithKline
Produtos Farmacêuticos, Lda
Rua Dr. António Loureiro Borges, 3
Arquiparque - Miraflores
1495-131 Algés
T: 214129500

9th Western Pacific Congress on Chemotherapy and Infectious Diseases
December 01 - December 05, 2004
Bangkok, Thailand
Contact: Rawee T.
Phone: 662-716-6534
Fax: 662-716-6535
E-Mail: wpccid2004@idthai.org

The 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections
February 22-25, 2005
Boston, Massachusetts, USA
Contact: CROI Secretariat
115 South Saint Asaph Street
Alexandria, VA 22314, USA
Telephone: 703-535-6862
Fax: 703-535-6899
e-mail: info@retroconference.org

1st European Consensus Conference on the Treatment of Chronic Hepatitis B and C in HIV Co-infected Patients
March 01, 2005 - March 02, 2005
Paris, France
Contact: Wells Healthcare
Phone: 44-0-1-892-509-521
Fax: 44-0-1-892-511-400
E-Mail: secretariat@coinfectionecc.org

15th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases
April 02, 2005 - April 05, 2005
Copenhagen, Denmark
Contact: ESCMID-Executive Office, PO Box 6, CH-4005 Basel, Switzerland
Phone: 41-616-867-799
Fax: 41-616-867-798
E-Mail: escmid-eo@escmid.org



9th Conference of the International Society of Travel Medicine
May 1-5, 2005
Lisbon, Portugal
Contact: ISTM Europe Office
c/o Dept. of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Section of International Health, Georgenstr. 5, 80799 Munich, Germany
Phone: +49 89 340 20 966
Fax: +49 89 33 60 3
E-mail - cistm9@istm.org

Medicine and Health in the Tropics
11-15 September 2005
Marseille - France
Contact: Albine Conseil
67, rue Anatole France - 92309
Levallois-Perret cedex - FRANCE
Tel. +33 1 41 05 94 10
Fax +33 1 41 05 94 19
E-mail - alexandra@albine-conseil.fr

12th International Congress on Infectious Diseases
June 15-18, 2006
Lisbon, Portugal
Contact: International Society for Infectious Diseases
181 Longwood Avenue - Boston, MA 02115 - USA
Phone: (617) 277-0551
Fax: (617) 731-1541
E-mail - info@isid.org

Site da Comissão Nacional de Luta Contra a Sida (CNLCS)
http://www.cnlcs.pt

Página Inicial



Modos de transmissão



Links Internacionais



Rede de Centros de Acolhimento e Detecção VIH/SIDA



A busca constante de informação actualizada, em sites de reconhecida idoneidade científica, com particular relevo para a Organização Mundial de Saúde na suas diversificadas actividades.
Em Portugal, um site institucional, o da Comissão Nacional de Luta Contra a SIDA, e, outro de uma empresa farmacêutica, a GSK, a merecerem destaque nesta edição.

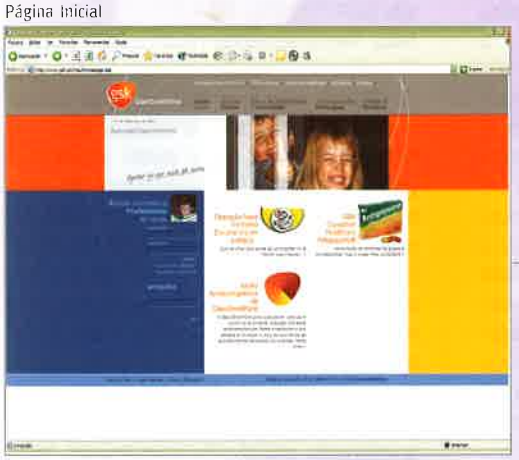
Sites Internacionais

Antimicrobial resistance information bank
http://oms2.b3e.jussieu.fr/arinfobank/
Buruli ulcer
http://www.who.int/gtb-buruli
Cholera
http://www.who.int/csr/disease/cholera
Deliberate use of biological and chemical agents
http://www.who.int/csr/delibepidemics/
Dengue (DengueNet)
http://oms2.b3e.jussieu.fr/DengueNet
Eradication/elimination programmes
http://www.who.int/infectious-disease-news/
Filariasis
http://www.filariasis.org
Geographical information systems (GIS)
http://www.who.int/csr/mapping/
Global atlas of infectious diseases
http://globalatlas.who.int
Health topics
http://www.who.int
Infectious diseases
http://www.who.int/health-topics/idindex.htm
Influenza network (FluNet)
http://oms.b3e.jussieu.fr/flunet/
Integrated management of childhood illnesses
http://www.who.int/chd/
International travel and health
http://www.who.int/ith/
Intestinal parasites
http://www.who.int/wormcontrol/
Leishmaniasis
http://www.who.int/leishmaniasis/en/
Leprosy
http://www.who.int/lep/
Malaria
http://www.rbm.who.int

Newsletter (Action against infection)
http://www.who.int/infectious-disease-news/
Outbreaks
http://www.who.int/csr/don
Poliomyelitis
http://www.who.int/gpv/
Rabies network (RABNET)
http://www.who.int/rabies
Report on infectious diseases
http://www.who.int/infectious-disease-report/
Salmonella surveillance network
http://www.who.int/salmsurv
Smallpox
http://www.who.int/csr/disease/smallpox/
Surveillance and response
http://www.who.int/csr/
Tropical disease research
http://www.who.int/tdr/
Tuberculosis
http://www.who.int/gtb/ and/e **http://www.stoptb.org**
Vaccines
http://www.who.int/gpv/
Weekly epidemiological record
http://www.who.int/wer/
WHO Office in Lyon
http://www.who.int/csr/labepidemiology
WHO Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES)
http://www.who.int/ctd/whopes/
WHO Mediterranean Centre, Tunis
http://wmc.who.int

Sites Portugueses
Associação Portuguesa de Estudo Clínico da SIDA (APECS)
http://www.apecs.pt
Comissão Nacional de Luta Contra a Sida (CNLCS)
http://www.cnlcs.pt

Página Inicial

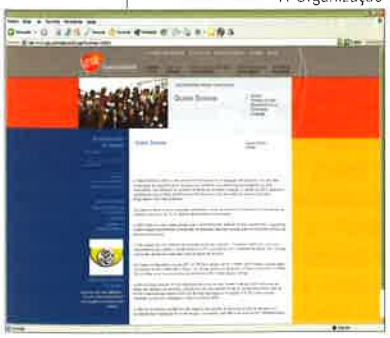


Site da GlaxoSmithKline
http://www.gsk.pt

Núcleo Farmacológico



A Organização



Info Patologias



Operação Nariz Vermelho





"Hitler saiu de dentro da democracia, foi produzido por ela. À medida que ela for mudando, formas modernas de Hitler podem surgir: o diabo muda de aspecto."

Hans Jürgen Syberbeg

"(...) Em muitas Revistas de reconhecido prestígio científico, uma das mais estimulantes secções é a das "*letters*" (*British Medical Jounal, JAMA, Annals of Internal Medicine*, etc.) ou "*correspondence*" (*The Lancet, The New England Journal of Medicine*, etc.). Com efeito, ali se clarificam aspectos menos conseguidos em trabalhos publicados, se corrigem imprecisões, se antecipam resultados ainda não publicados, etc. Dir-se-ia que aquelas secções assumem, verdadeiramente, uma função pedagógica na pós-graduação e na investigação, e complementam mesmo a acção dos consultores científicos das revistas, consultores esses que se sabe serem actuantes. E nem sequer os autores acusam qualquer susceptibilidade, posto que, em boa verdade, da troca de ideias e conhecimentos resulta um enriquecimento mútuo. Todavia, em Portugal, por insondáveis desígnios, a prática das cartas ao editor não tem lugar (...)" - escrevíamos nós, em colaboração, nos idos de 1994.[1] Ora, a ideia que então se avançou (pôr os médicos a dialogar e a trocar impressões e experiências) não frutificou, nem na nossa Revista nem em *nenhuma* outra revista médica portuguesa - idiossincrasias da mentalidade lusa?...

Pela minha parte, retorno "à vaca fria" - isto é, reincido na tentativa de reabertura do *dossier* "Cartas ao Editor".

Vêm as considerações que precedem a propósito do justo e oportuno editorial do Dr. Leça da Veiga - amigo de espírito aberto, que eu sempre me habituei a admirar e respeitar -, publicado no último número da nossa Revista, sob o título "*Raças Humanas; um erro indesculpável ou, apenas, ignorância quanto baste*".[2]

Para que não subsistam dúvidas, começarei por deixar bem claro que concordo 100% com a sua postura contra a utilização pelos médicos da palavra "raça", quando reportada à espécie humana!

Sem assumir o papel de "advogado do diabo", permito-me, todavia, discordar o seu tanto dos argumentos que o editorialista utiliza - e isto porque esses argumentos fragilizam a sua (e também minha) posição nesta matéria. Cingindo-me tão-só ao modesto acervo da minha biblioteca pessoal, começarei por compulsar o livro *Fundamentos de Zoologia Sistemática*, da autoria do Prof. Amílcar Mateus, médico e biólogo, de que verterei para aqui a seguinte passagem: "(...) O termo *raça*, tantas vezes mal aplicado, deve considerar-se como correspondente à subespécie, tratando-se de animais domésticos. (...) O mesmo critério se aplica às raças humanas, pois o Homem é o animal doméstico por excelência. (...)".[3]

Pretendo, pois, significar que, argumentando em termos de Biologia, Sistemática ou Taxinomia, estamos nós, os opositores da designação de "raça humana", a ceder terreno aos nossos adversários, pela simples e elementar razão de que a raça se define, em termos biológicos, por caracteres *morfológicos*, que não genéticos - daí que os bem intencionados argumentos do Dr. Leça da Veiga não colham, quando afirma: "(...) É tempo de saber absorver, com consistência, o que a Genética ensina (...)".

Passo agora ao sector de livros de Antropologia, sendo que em Antropologia será suposto que os cientistas recusem a designação de "raça" para o animal *Anthropos, o Homo sapiens*. Ora, muito embora se espere que os cientistas da Antropologia Física façam do conceito de "raça" a sua pedra de toque, verifico que, também, surpreendentemente, aos cientistas da Antropologia Cultural não se lhes dá utilizarem um tal conceito "racial". Assim acontece, com efeito, em *L'Anthropologie*, extenso volume dos tão reputados *Les Dictionnaires du Savoir Moderne*: "(...) *L'espèce humaine est composée de très nombreuses variétés naturelles auxquelles on peut donner indifféremment le nom de races, de populations ou de sous-espèces; ces groupements humains ont* la même définition qu'une "race" animale quelconque (...). *Le groupe acquiert donc* (...) *une certaine uniformité* morphologique. (...)" [sublinhados meus].[4] Mas é ainda maior a surpresa quando compulso a monumental obra *As Raças Humanas* (!), em quatro grossos volumes, de que para aqui transcreverei apenas a seguinte passagem, extraída da secção "*Conceito de Raça*": um "(...) aspecto conceptual que pode prestar-se a confusão é a diferença entre uma raça, sob o ponto de vista *biológico*, e uma etnia ou um povo, que são *entidades estritamente culturais ou históricas* (...)".[5]

Não, decididamente não é no terreno "citacionista" (os opositores do conceito de "raça" citarão *X* autores, mas os defensores desse conceito citarão, facilmente, *X+Y*...), nem sequer pelas vias antropológica e biológica (mesmo fazendo apelo à Biologia Molecular e à Genética, que se esgotam no conceito de espécie!) que lá chegaremos - e acabamos por tropeçar, com alguma surpresa, até mesmo na *legalidade constitucional*, como veremos mais abaixo. Entendo, pois, que é no terreno da CIDADANIA que nos devemos posicionar, para acabar de vez com a utilização espúria do conceito de "raça humana", sequer ao menos em Medicina. A dignidade humana e a Democracia pressupõem que, enquanto indivíduos, todos nós somos diferentes (a menos que os revivalistas e saudosistas dos totalitarismos nos pretendam trazer de volta universos concentracionários, escudados na lógica do "rebanho"), mas que, enquanto espécie humana, todos nós somos iguais - iguais em direitos e em respeitabilidade. É, pois, em nome destes valores - e da equidade e do direito à não discriminação - que eu recuso, liminarmente, a designação de "raça", adentro da espécie humana, e que, como cidadão responsável, tenho procurado, pelo exemplo, dar também o meu contributo a esta causa. Com efeito, quando assumi pela primeira vez, há cerca de 30 anos, a responsabilidade de uma "tira" de uma enfermaria, "decretei", desde logo, a abolição do vocábulo "raça" para

todos os meus doentes, como se mostra em alguns exemplos do seguinte escorço: "(...) Paciente do sexo masculino, de quatro anos de idade, melanodérmico, pertencente à etnia Bakongo (...)";[6] "(...) Indivíduo leucodérmico, de cerca de 50 anos de idade, do sexo masculino (...)";[7] "(...) M. C. D., do sexo feminino, de 14 anos de idade, leuco-melanodérmica, natural de Malange (...)".[8]

Dir-me-ão, possivelmente, alguns idealistas demasiado extremados, que mesmo as designações *leucodérmico*, *melanodérmico* e *leuco-melanodérmico* (a designação *xantodérmico* só excepcionalmente terá cabimento no caso português) deverão ser abandonadas. Todavia, *enquanto médico*, não prescindo de uma tipologia clinicamente tipificante do paciente que tenho de tentar tratar. Exemplifico: se, perante um doente melanodérmico, me for referida - por exemplo, por um interno - uma anemia com determinadas características, não poderei deixar de colocar, então, a hipótese de diagnóstico de uma hemoglobinopatia, *v. g.* a drepanocitose. Acrescentarei que, em relação às pretensas "raças" humanas, para mim tudo se passa, afinal, na prática quotidiana da Medicina, como por exemplo com os credos religiosos de um qualquer doente: *je m'en fous* em absoluto se o indivíduo que tenho diante de mim é católico, protestante, judeu, islâmico, agnóstico ou ateu. Contudo, perante um quadro clínico de anemia aguda, não poderei deixar de valorizar o facto de o meu doente ser uma "testemunha de Jeová" (e registar mesmo este dado a vermelho no processo clínico, para que, na minha ausência, os outros médicos também o saibam), uma vez que a ignorância desta informação clínica poderá comportar - positiva ou negativamente - consequências importantes para o doente e para o médico.

E, para terminar - e não escamoteemos os escolhos éticos e legais que se nos colocam nesta problemática -, evocarei ainda a *Constituição da República Portuguesa*, no seu artigo 13º: "(...) Ninguém pode ser privilegiado, beneficiado, prejudicado, privado de qualquer direito ou isento de qualquer dever em razão de ascendência, sexo, *raça*, língua, território de origem, religião, convicções políticas ou ideológicas, instrução, situação económica ou condição social. (...)" [obviamente que o sublinhado é meu].[9] Notemos que a nossa Constituição - uma das mais avançadas do mundo em matéria de direitos fundamentais dos cidadãos - não aboliu a designação de raça: o que ela postula, todavia, é que tal facto não deve nem pode servir de motivo de *discriminação*.

Em síntese: entendo que nós, *enquanto médicos* - detentores de uma formação e cultura humanísticas -, devemos rejeitar, em coerência, liminarmente o vocábulo "raça", no entendimento de que ele pode comportar, na prática corrente da Medicina, um factor discriminatório para o nosso doente e um atentado à sua dignidade. Obviamente que a problemática da "raça" se insere numa outra muito mais ampla, qual seja a *Educação para a Cidadania*, cujo curriculo, em nossa opinião, deveria constar em todos os graus de ensino.

Évora, 27 de Dezembro de 2003
J. A. David de Morais



Bibliografia

1 David de Morais, J. A.; Filipe, Armindo. Cartas ao Editor. Rev Port. Doenç Infec 1997; 20 (3): 194-6.
2 Leça da Veiga, Carlos. Editorial. Rev Portuguesa Doenç Infec 2003; 2 (2; 2ª série): 3-4.
3 Mateus, Amílcar. Fundamentos de Zoologia Sistemática. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1989.
4 Petit-Maire, Nicole. L'Anthropologie Biologique. In: Vários. L'Anthropologie. Paris: Les Dictionnaires du Savoir Moderne, Centre d'Étude et de Promotion de la Lecture, 1972, pp. 264-83.
5 Bertranpetit, J; Hernández, M. A Origem do Homem. In: Vários. As Raças Humanas. Barcelona: Resomnia Editora de Livros e Publicações, 1988, vol. I, pp. 2-47.
6 David de Morais, J. A. Esplenomegália macroglobulinémica de Charmot ou "síndrome de esplenomegália tropical": apresentação do primeiro caso diagnosticado em Angola e revisão da literatura mundial. An Instituto de Higiene e Med Trop 1977/78; 5 (1-4): 293-323.
7 David de Morais, J. A. Paludismo cloroquino-resistente em África. A propósito de um caso observado em Angola. Rev Portuguesa Doenç Infec 1978; 1 (5): 441-3.
8 David de Morais, J. A. Schistosomíase mansoni em Angola: notas sobre a sua recente difusão. An Instituto de Higiene e Med Trop 1975; 3 (1-4): 405-23.
9 Constituição da República Portuguesa. Coimbra: Livraria Almedina, 1989.



A sua opinião é importante... ... participe!

A **Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas** concebeu este espaço para si. À semelhança de qualquer fórum, debateremos, responderemos e elucidaremos questões.
Acreditamos que este vai ser um espaço de interesse e debate para todos os tipos de leitores.
Sob o arbítrio do Conselho Redactorial da **RPDI**, publicaremos as respostas às questões que nos forem apresentadas pelos nossos leitores, independentemente de serem ou não assinantes da Revista.

Envie-nos as suas opiniões, questões, artigos e/ou sugestões para:
Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas - Forum | Av. Óscar Monteiro Torres, 16 R/c Esq. - 1000-219 Lisboa
Tel.: 217 817 180; Fax: 217 951 299 | spdi_dir@msn.com

NORMAS DE PUBLICAÇÃO

A **Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas** aceita para publicação "Artigos Originais", "Artigos de Revisão", "Casos Clínicos", "Casos Clínicos em *Flash*", "*Posters*", "Recomendações", "Imagens Clínicas" e "Cartas ao Director", que se relacionem com o vasto campo da patologia infecciosa, dentro dos seus múltiplos aspectos epidemiológicos, etiológicos, fisiopatológicos, clínicos, laboratoriais, terapêuticos, profilácticos e de saúde pública, e abrangendo os domínios da bacteriologia, virologia, microbiologia, parasitologia, imunopatologia, farmacologia, etc.
Os originais deverão ser enviados para a morada acima referenciada, dirigidas ao Conselho Redactorial da **RPDI**.
Os "Artigos Originais" submetidos para publicação deverão ser preparados de acordo com os "Requisitos Uniformes para Apresentação de Manuscritos a Revistas Biomédicas" elaborados pela Comissão Internacional de Editores de Revistas Médicas (*N Engl J Med 1991; 324: 424-428*), que se resume mais adiante.
Os artigos aceites para publicação passarão a ser propriedade da **Sociedade Portuguesa de Doenças Infecciosas**, não podendo ser reproduzidos, no todo ou em parte, sem autorização por escrito desta Sociedade.
Os originais, escritos em português ou em inglês, devem ser enviados em suporte informático, acompanhados de duas cópias impressas. O ficheiro deverá ser escrito em *Microsoft Word*, sem tabulações nem indentações. No caso de o conteúdo conter imagens, deverá o autor, sempre que possível, remeter-nos as mesmas em papel fotográfico ou slide para posterior digitalização e tratamento.

Artigos Originais

Os "Artigos Originais" devem ser preparados, segundo a seguinte ordem, iniciando-se cada item numa página separada: 1. Página do título; 2. Resumo; 3. Introdução; 4. Material e Métodos; 5. Resultados; 6. Discussão; 7. Bibliografia; 8. Legendas; 9. Figuras; 10. Quadros. Todas as páginas devem ser numeradas no canto superior direito. A numeração das referências, tabelas e quadros deve ser feita pela ordem de aparecimento no texto.

1. Página do Título

1. Título - Deve ser conciso, não conter abreviaturas e não ultrapassar os 120 caracteres. Poderá englobar um subtítulo com um máximo de 45 caracteres.
2. Autores - A identificação dos autores deve ser feita com a(s) inicial(is) do(s) primeiro(s) nome(s) e com o apelido. Deverá ser feita a identificação completa do serviço, departamento ou instituição onde o trabalho foi realizado.
3. Patrocínios - Deverão ser referidas todas as entidades que patrocinaram o trabalho.
4. Correspondência - Referir o nome, endereço, telefone, fax e e-mail do autor a quem deve ser enviada a correspondência.

2. Resumo

Os resumos são redigidos em português e inglês, não devendo ultrapassar as 200 palavras. Devem ser organizados segundo os seguintes itens: Introdução, Objectivos, Métodos, Resultados e Conclusões. Não devem conter abreviaturas, referências ou notas de rodapé.

3. Texto

Não deve ultrapassar as 12 páginas. Deve incluir referência à aprovação da Comissão de Ética da Instituição e aos métodos estatísticos utilizados. Todos os fármacos devem ser referidos pelo seu nome genérico, sendo eventuais referências a nomes comerciais, acompanhadas do nome e cidade do fabricante, feitas em rodapé.
As abreviaturas, que são desaconselhadas, devem ser especificadas na sua primeira utilização. Os parâmetros utilizados devem ser expressos em Unidades Internacionais, com indicação dos valores normais. A identificação das figuras deverá ser feita em numeração árabe, e a dos quadros em numeração romana.

4. Bibliografia

Deve ser referenciada em numeração árabe, por ordem de aparecimento no texto.

5. Legendas

Devem ser dactilografadas a dois espaços em folhas separadas e numeradas em sequência. As legendas devem ser numeradas em algarismos árabes pela sequência da citação no texto, e fornecerem a informação suficiente para permitir a interpretação da figura sem necessidade de consulta do texto.

6. Fotografias

Todas as fotografias deverão ser enviadas em papel ou slide (não enviar fotografias em suporte informático digitalizadas em baixa resolução).

7. Quadros e Gráficos

Devem ser enviados em folhas separadas, dactilografadas a 2 espaços, identificados com o número de aparecimento no texto e com um título informativo na parte superior. Na parte inferior serão colocadas todas as notas informativas (abreviaturas, significado estatístico, etc.).

telzir®

fosamprenavir

Telzir® 700 mg comprimidos revestidos por película. **COMPOSIÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA** Cada comprimido revestido por película contém 700 mg de fosamprenavir sob a forma de fosamprenavir cálcico (equivalente a aproximadamente 600 mg de amprenavir). Ver Lista de excipientes. **FORMA FARMACÊUTICA** Comprimidos revestidos por película. Os comprimidos revestidos por película são de cor rosa, oblongos, biconvexos e com gravação GXLL7 numa das faces. **INFORMAÇÕES CLÍNICAS Indicações terapêuticas** Telzir, em associação com doses baixas de ritonavir, está indicado no tratamento de adultos infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (VIH-1), em associação com outros medicamentos antirretrovíricos. Em doentes sujeitos a tratamento prévio moderado com antirretrovíricos, Telzir em associação com doses baixas de ritonavir não demonstrou ser tão eficaz como lopinavir/ritonavir. A utilização de Telzir em associação com doses baixas de ritonavir em doentes previamente sujeitos a terapêutica altamente potente não foi suficientemente estudada. Em doentes sujeitos a tratamento prévio com inibidores da protease (IP), a escolha de Telzir deve ser baseada em testes de resistência vírica individual e na sua história terapêutica (ver Propriedades farmacodinâmicas). **Posologia e modo de administração** Telzir deve apenas ser administrado com doses baixas de ritonavir como um intensificador farmacocinético de amprenavir, e em associação com outros medicamentos antirretrovíricos. O Resumo das Características do Medicamento ritonavir deve ser consultado antes do início da terapêutica com Telzir. A terapêutica deve ser iniciada por um médico experiente no controlo da infecção pelo VIH. Telzir (fosamprenavir) é um pró-fármaco de amprenavir e não deve ser administrado concomitantemente com outros medicamentos contendo amprenavir. Deverá salientar-se a todos os doentes a importância da adesão ao regime posológico completo recomendado. Adultos (idade igual ou superior a 18 anos) Para doentes com e sem tratamento prévio com antirretrovíricos a dose recomendada é 700 mg de fosamprenavir duas vezes por dia com 100 mg de ritonavir duas vezes por dia, em associação com outros medicamentos antirretrovíricos (ver Propriedades farmacodinâmicas). Recomenda-se precaução se as doses recomedadas de fosamprenavir com ritonavir acima descritas forem excedidas (ver Advertências e precauções especiais de utilização). Crianças (idade inferior a 12 anos) e adolescentes (12 a 17 anos de idade). A segurança e eficácia de Telzir com ritonavir não foram ainda estabelecidas nesta população de doentes. Deste modo, esta associação não deve ser utilizada neste grupo populacional até se dispor de mais informação. Idosos (idade superior a 65 anos) A farmacocinética de fosamprenavir não foi estudada nesta população de doentes (ver Propriedades farmacocinéticas). Insuficiência renal Não se considera necessário ajuste da dose em doentes com insuficiência renal (ver Propriedades farmacocinéticas). Insuficiência hepática. A informação sobre a administração concomitante de Telzir e ritonavir em doentes com insuficiência hepática é limitada, não se podendo recomendar uma posologia específica. Assim, Telzir em associação com ritonavir deve ser utilizado com precaução em doentes com insuficiência hepática ligeira ou moderada e está contra-indicado em doentes com insuficiência hepática grave (ver Contra-indicações, Advertências e precauções especiais de utilização e Propriedades farmacocinéticas). Telzir é administrado oralmente. Telzir comprimidos com ritonavir podem ser tomados com ou sem alimentos. **Contra-indicações** Hipersensibilidade ao fosamprenavir, amprenavir ou a qualquer dos excipientes de Telzir, ou ao ritonavir. Doentes com insuficiência hepática grave (ver Advertências e precauções especiais de utilização e Propriedades farmacocinéticas).Telzir não deve ser administrado concomitantemente com medicamentos com janela terapêutica estreita que sejam substratos do citocromo P450 3A4 (CYP 3A4), por ex. amiodarona, astemizol, bepridil, cisaprida, dihidroergotamina, ergotamina, pimozida, quinidina, terfenadina, (ver Interacções medicamentosas e outras formas de interacção). Telzir com ritonavir não deve ser co-administrado com medicamentos com janela terapêutica estreita que sejam altamente dependentes do metabolismo por CYP2D6, por ex. flecainida e propafenona (ver Interacções medicamentosas e outras formas de interacção). Não se deve administrar rifampicina concomitantemente com Telzir (ver Interacções medicamentosas e outras formas de interacção). As preparações medicinais contendo erva de S. João (*Hypericum perforatum*) não devem ser usadas concomitantemente com Telzir devido ao risco de diminuição das concentrações plasmáticas e dos efeitos clínicos do amprenavir (ver Interacções medicamentosas e outras formas de interacção). **Advertências e precauções especiais de utilização** Os doentes devem ser alertados de que o tratamento com Telzir, ou qualquer outra terapêutica antirretrovírica corrente, não cura a infecção VIH, podendo continuar a desenvolver infecções oportunistas e outras complicações da infecção VIH. As terapêuticas antirretrovíricas correntes, incluindo Telzir, não demonstraram prevenir o risco de transmissão do VIH a outros indivíduos por contacto sexual ou transmissão sanguínea. Devem manter-se as precauções adequadas. O fosamprenavir contém uma parte de sulfonamida. Desconhece-se o potencial de sensibilidade cruzada entre medicamentos da classe das sulfonamidas e fosamprenavir. Nos estudos piloto de Telzir, em doentes tratados com fosamprenavir com ritonavir, não houve evidência de aumento do risco de rash em doentes com história de alergia a sulfonamidas versus os que não tinham alergia às sulfonamidas. Mesmo assim, Telzir deve ser utilizado com precaução em doentes com alergia conhecida a sulfonamidas. A administração concomitante de 700 mg de Telzir duas vezes dia com ritonavir em doses superiores a 100 mg duas vezes dia, não foi clinicamente avaliada. A utilização de doses superiores de ritonavir pode alterar o perfil de segurança da associação e por isso não é recomendada. **Doença hepática** Não foi estabelecida a segurança e eficácia de Telzir em doentes com doença hepática significativa subjacente. Telzir deve ser utilizado com precaução em doentes com insuficiência hepática ligeira ou moderada e está contra-indicado em doentes com insuficiência hepática grave. Os doentes com hepatite B ou C crónica e tratados com terapêutica de associação antirretrovírica têm um risco acrescido de efeitos adversos hepáticos graves e potencialmente fatais. No caso de terapêutica antivírica para a hepatite B ou C concomitante, deverá ser consultado o Resumo das Características desses Medicamentos. Os doentes com disfunção hepática pré-existente, incluindo hepatite crónica activa, apresentam um aumento da frequência de anomalias da função hepática durante a terapêutica de associação antirretrovírica e devem ser monitorizados de acordo com a prática padronizada. Se se verificar agravamento da doença hepática, deverá ser considerada a interrupção ou descontinuação do tratamento destes doentes. **Medicamentos – interacções** Não se recomenda a utilização concomitante de Telzir com midazolam ou triazolam (ver Interacções medicamentosas e outras formas de interacção). Não se recomenda a utilização concomitante de Telzir com halofantrina ou lidocaína (sistémica). Não se recomenda a utilização concomitante de Telzir com inibidores da PDE5 (por ex. sildenafil e vardenafil) (ver Interacções medicamentosas e outras formas de interacção). Não se recomenda a utilização concomitante de Telzir com sinvastatina ou lovastatina devido ao aumento do risco de miopatia, incluindo rabdomiólise (ver Interacções medicamentosas e outras formas de interacção). Recomenda-se redução da dose de rifabutina em pelo menos 75%, quando administrada com Telzir com ritonavir. Poderá ser necessário uma maior redução da dose (ver Interacções medicamentosas e outras formas de interacção). A eficácia dos anticoncepcionais hormonais poderá ser alterada devido a interacções com amprenavir. Assim, recomenda-se que as mulheres em idade fértil utilizem como alternativa métodos anticoncepcionais de barreira seguros (ver Interacções medicamentosas e outras formas de interacção). Os medicamentos anticonvulsivantes (carbamazepina, fenobarbital, fenitoína) devem ser utilizados com precaução. Telzir poderá ser menos eficaz em doentes que tomam estes medicamentos concomitantemente, devido ao decréscimo das concentrações plasmáticas de amprenavir (ver Interacções medicamentosas e outras formas de interacção). Recomenda-se monitorização das concentrações terapêuticas dos medicamentos imunosupressores (ciclosporina, tacrolimos, rapamicina) quando co-administrados com Telzir (ver Interacções medicamentosas e outras formas de interacção). Recomenda-se monitorização das concentrações terapêuticas dos antidepressivos tricíclicos (i.e. desipramina e nortriptilina) quando co-administrados com Telzir (ver Interacções medicamentosas e outras formas de interacção). Quando a metadona é co-administrada com Telzir, os doentes devem ser cuidadosamente monitorizados quanto ao síndrome de abstinência de opióides (ver Interacções medicamentosas e outras formas de interacção). Recomenda-se um aumento da monitorização do INR (International normalised ratio) quando a varfarina ou outro anticoagulante oral é co-administrado com Telzir (ver Interacções medicamentosas e outras formas de interacção). **Rash / reacções cutâneas** A maioria dos doentes com rash cutâneo ligeiro ou moderado pode manter o tratamento com Telzir. A utilização de anti-histamínicos adequados (por ex. dicloridrato de cetirizina) pode reduzir o prurido e acelerar a resolução do rash cutâneo. Foram notificadas reacções cutâneas graves e potencialmente fatais, incluindo síndrome de Stevens-Johnson, em menos de 1% dos doentes incluídos no programa de desenvolvimento clínico. O tratamento com Telzir deverá ser permanentemente interrompido em caso de rash cutâneo grave ou em caso de rash de intensidade moderada acompanhado de sintomas sistémicos ou envolvimento das mucosas (ver Efeitos indesejáveis). **Doentes hemofílicos** Em doentes hemofílicos do tipo A e B tratados com inibidores da protease (IP) foi relatado aumento da hemorragia, incluindo hematoma cutâneo espontâneo e hemartroses. Em alguns doentes foi necessário administrar factor VIII adicional. Em mais de metade dos casos relatados, o tratamento com inibidores da protease foi mantido ou reiniciado caso tivesse sido interrompido. Foi sugerida relação causal, no entanto, o mecanismo de acção não foi clarificado. Os doentes hemofílicos devem portanto ter conhecimento da possibilidade de aumento das hemorragias. **Hiperglicemia** Foi relatado desenvolvimento de diabetes *mellitus*, hiperglicemia ou exacerbação de diabetes *mellitus* pré-existente em doentes tratados com antirretrovíricos, incluindo inibidores da protease. Em alguns destes doentes, a hiperglicemia foi grave e, em alguns casos, associada a cetoacidose. Muitos dos doentes apresentavam um quadro clínico confuso, alguns requerendo terapêutica com fármacos associados ao desenvolvimento de diabetes *mellitus* ou hiperglicemia. **Lipodistrofia** A terapêutica de associação antirretrovírica tem sido associada a redistribuição do tecido adiposo corporal (lipodistrofia) em doentes infectados pelo VIH. As consequências a longo prazo deste efeito são actualmente desconhecidas. O conhecimento sobre o mecanismo é incompleto. Foi colocada a hipótese de existir uma relação entre a lipomatose visceral, os inibidores da protease, a lipoatrofia e os nucleósidos inibidores da transcriptase reversa. Um risco acrescido de lipodistrofia foi associado a factores individuais, tais como a idade avançada, e com factores relacionados com o fármaco, como a longa duração da terapêutica antirretrovírica e as alterações metabólicas associadas. O exame clínico deve incluir a avaliação dos sinais físicos da redistribuição do tecido adiposo. Deverá considerar-se a medição dos níveis de lípidos séricos e da glicemia em jejum. As alterações lipídicas metabólicas associadas. O exame clínico deve incluir a avaliação dos sinais físicos da redistribuição do tecido adiposo. Deverá considerar-se a medição dos níveis de lípidos séricos e da glicemia em jejum. As alterações lipídicas devem ser tratadas de modo clinicamente apropriado (ver Efeitos indesejáveis). **Interacções medicamentosas e outras formas de interacção** Quando o fosamprenavir e ritonavir são administrados concomitantemente o perfil de interacção metabólica do ritonavir pode ser predominante porque o ritonavir é um inibidor mais potente do CYP3A4. Portanto, deve ser consultada a informação completa sobre a prescrição de ritonavir antes de se iniciar a terapêutica com Telzir e ritonavir. O ritonavir também inibe o CYP2D6 mas numa extensão menor que o CYP3A4. O ritonavir induz o CYP3A4, CYP1A2, CYP2C9 e a transferase glucuronosilo. Adicionalmente, ambos amprenavir, o metabolito activo de fosamprenavir, e ritonavir, são principalmente metabolisados no fígado pela enzima CYP3A4. Portanto, todos os medicamentos que partilhem esta via metabólica ou que alterem a actividade da CYP3A4 podem alterar a farmacocinética do amprenavir e ritonavir. Do mesmo modo, a administração de fosamprenavir e ritonavir pode também alterar a farmacocinética de outras substâncias activas que partilhem esta via metabólica. • Associações contra-indicadas (ver Contra-indicações) **Substratos da CYP3A4 com índice terapêutico estreito:** Telzir não deve ser administrado concomitantemente com medicamentos com janela terapêutica estreita contendo substâncias activas que sejam substrato do citocromo P450 3A4 (CYP3A4). A administração concomitante pode resultar numa inibição competitiva do metabolismo destas substâncias activas, levando ao aumento dos níveis plasmáticos e conduzindo a reacções adversas graves e/ou com risco de vida, tais como arritmias cardíacas (por ex: amiodarona, astemizol, bepridil, cisaprida, pimozida, quinidina, terfenadina) ou vasospasmo periférico ou isquémia (por ex. ergotamina, dihidroergotamina). **Substratos da CYP2D6 com índice terapêutico estreito:** Telzir com ritonavir não devem ser co-administrados com medicamentos contendo substâncias activas altamente dependentes do metabolismo por CYP2D6 e para os quais estão associadas reacções adversas graves e/ou com risco de vida em concentrações elevadas no plasma. Estas substâncias activas incluem a flecainida e propafenona. **Rifampicina:** A rifampicina reduz a AUC plasmática do amprenavir em aproximadamente 82%. Com base na informação de outros inibidores da protease, é esperado que a co-administração de Telzir com ritonavir com rifampicina também resulte num grande decréscimo das concentrações plasmáticas de amprenavir. De acordo com este dados, Telzir com ritonavir não devem ser administrados concomitantemente com rifampicina. **Erva de São João** *(Hypericum perforatum)*: Os níveis séricos de amprenavir e ritonavir podem ser reduzidos pela utilização concomitante da preparação medicinal erva de São João (*Hypericum perforatum*). Este efeito deve-se à indução das enzimas metabolizadoras pela erva de São João. Portanto, as preparações medicinais contendo erva de São João não devem ser associadas a Telzir com ritonavir. Caso o doente já esteja a tomar erva de São João, devem verificar-se os níveis de amprenavir, ritonavir e, se possível, os níveis virais, e interromper a administração da erva de São João. Os níveis de amprenavir e ritonavir poderão aumentar quando for interrompida a administração da erva de São João. O efeito indutor poderá persistir durante pelo menos 2 semanas após interrupção do tratamento com erva de São João. • Outras associações **Medicamentos antirretrovíricos** *Inibidores da transcriptase reversa não nucleósidos* Efavirenze: não se verificaram interacções clínicas relevantes quando se administrou concomitantemente 700 mg de fosamprenavir duas vezes dia e 100 mg de ritonavir uma vez dia com efavirenze (600 mg uma vez dia). Nevirapina: com base no efeito da nevirapina sobre outros inibidores da protease do VIH, a nevirapina poderá diminuir as concentrações séricas de amprenavir. Não foram estabelecidas doses apropriadas relativamente à segurança e eficácia desta associação. Esta associação deve ser utilizada com precaução. *Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleósidos /nucleótidos*. Foram realizados estudos de interacção entre amprenavir, sem ritonavir, e abacavir, lamivudina e zidovudina. Com base nos dados obtidos neste estudo e porque não é esperado que ritonavir tenha um impacto significativo na farmacocinética dos INTRs, não se espera que a co-administração de fosamprenavir e ritonavir com estes medicamentos altere significativamente a exposição das substâncias activas co-administradas. Comprimido para mastigar de didanosina: não foram efectuados estudos farmacocinéticos com fosamprenavir em associação com didanosina. Interacções clínicas significativas resultantes do aumento do pH do estômago devido ao componente antiácido da didanosina é improvável, e não se considera necessário a separação ou ajuste da dose quando fosamprenavir e didanosina são administrados concomitantemente (ver Antiácidos). Não se esperam interacções significativas com as cápsulas gastro-resistentes de didanosina. **Tenofovir:** não é, por enquanto, possível recomendar a co-administração de fosamprenavir com ritonavir com tenofovir. *Inibidores da Protease* Lopinavir / ritonavir: não é possível recomendar posologia para a administração concomitante de Telzir com ritonavir e lopinavir/ritonavir, aconselhando-se, no entanto, monitorização frequente, uma vez que se desconhece a segurança e eficácia desta associação. A C_{max}, AUC e C_{min} do lopinavir aumentaram 30%, 37% e 52%, respectivamente, quando 400 mg de lopinavir com 100 mg de ritonavir, duas vezes dia, foram administradas com 700 mg de fosamprenavir com 100 mg de ritonavir, duas vezes dia, durante duas semanas. A C_{max}, AUC e C_{min} do amprenavir diminuíram 58%, 63% e 65%, respectivamente. Quando 533 mg de lopinavir com 133 mg de ritonavir foram administrados em associação com 1400 mg de fosamprenavir, duas vezes dia, durante duas semanas, a C_{max}, AUC, e C_{min} do lopinavir não foram alteradas, comparativamente aos valores observados para 400 mg de lopinavir com 100 mg de ritonavir, duas vezes dia. Contudo, a AUC e Cmin de amprenavir diminuíram 26% e 42% respectivamente, enquanto que a C_{max} não foi significativamente alterada, comparativamente aos valores obtidos para 700 mg de fosamprenavir com 100 mg de ritonavir, duas vezes dia. Não foram efectuados estudos de interacção entre fosamprenavir com ritonavir e os seguintes inibidores da protease: indinavir, saquinavir, nelfinavir e atazanavir. **Antibióticos / Antifúngicos** Claritromicina: deve ser considerada redução da dose de claritromicina quando co-administrada com Telzir com ritonavir em doentes com insuficiência renal, uma vez que se espera um aumento moderado das concentrações de claritromicina quando administrada concomitantemente com Telzir com ritonavir. Eritromicina: não foram efectuados estudos farmacocinéticos com fosamprenavir com ritonavir em associação com eritromicina, no entanto, os níveis plasmáticos de eritromicina poderão estar aumentados em caso de administração concomitante. Cetoconazol / Itraconazol: A administração de amprenavir com cetoconazol aumentou a AUC do cetoconazol em 44%. Quando o ritonavir é administrado concomitantemente pode ocorrer um maior aumento da concentração de cetoconazol. É esperado que as concentrações de itraconazol aumentem da mesma maneira que as do cetoconazol. Na ausência de estudos específicos de fosamprenavir com ritonavir em associação com cetoconazol ou itraconazol não se podem efectuar recomendações relativamente a ajuste da dose. Rifabutina: a administração concomitante de amprenavir com rifabutina resulta num aumento de 200% das concentrações plasmáticas (AUC) da rifabutina o que pode potencialmente levar a um aumento das reacções adversas relacionados com a rifabutina, como uveíte. Quando o ritonavir é administrado concomitantemente, pode ocorrer um maior aumento das concentrações de rifabutina. Recomenda-se uma redução de pelo menos 75% na dose de rifabutina, quando administrada com Telzir com ritonavir. Poderão ser necessárias reduções da dose adicionais. **Outros medicamentos** *Medicamentos que podem reduzir a concentração plasmática de amprenavir quando administrados concomitantemente com Telzir* Antiácidos, antagonistas dos receptores H_2 da histamina e inibidores da bomba de protões: não se considera necessário ajuste da dose para nenhum dos medicamentos quando antiácidos, inibidores da bomba de protões ou antagonistas dos receptores H_2 da histamina são administrados concomitantemente com fosamprenavir. A AUC e C_{max} de amprenavir diminuíram 18% e 35% respectivamente, enquanto a C_{min} (C12h) foi idêntica; quando uma única dose de 1400 mg de fosamprenavir foi administrada concomitantemente com uma única dose de 30 ml de suspensão de antiácido (equivalente a 3,6 gramas de hidróxido de alumínio e 1,8 gramas de hidróxido de magnésio).Os níveis séricos de amprenavir podem ser reduzidos pelo uso concomitante de antagonistas dos receptores H_2 da histamina (por ex. ranitidina e cimetidina). A administração concomitante de ranitidina (dose única de 300 mg) com fosamprenavir (dose única de 1400 mg) diminuíram em 30% a AUC e em 51% a C_{max} de amprenavir. Não se observaram alterações na C_{min} (C12h) de amprenavir. Substâncias activas anticonvulsivantes: a administração concomitante de substâncias activas anticonvulsivantes, conhecidas como indutores enzimáticos (fenitoína, fenobarbital, carbamazepina) com fosamprenavir, pode levar a uma diminuição da concentração plasmática de amprenavir. Estas associações devem ser utilizadas com precaução. *Medicamentos cujas concentrações plasmáticas podem ser aumentadas quando administrados concomitantemente com Telzir* Outros medicamentos com janela terapêutica estreita: algumas substâncias (por ex. lidocaína (por via sistémica) e halofantrina), quando administradas com Telzir, podem provocar reacções adversas graves. Não se recomenda a sua administração concomitante. Benzodiazepinas: a utilização concomitante de Telzir com midazolam ou triazolam pode resultar em sedação prolongada ou depressão respiratória e por isso não é recomendada. Medicamentos para a disfunção eréctil: não se recomenda a administração concomitante. Com base na informação relativa a ritonavir e outros inibidores da protease, espera-se um aumento substancial das concentrações plasmáticas dos inibidores da PDE5 (por ex. sildenafil e vardenafil), quando administrados concomitantemente com Telzir com ritonavir, e pode resultar num aumento das reacções adversas associadas aos inibidores da PDE5, incluindo hipotensão, alterações da visão e priapismo. Inibidores da HMG-CoA redutase: se estiver indicado tratamento com inibidores da HMG-CoA redutase, recomenda-se a utilização de pravastatina ou fluvastatina porque o seu metabolismo não é dependente da CYP3A4, e não são esperadas interacções com os inibidores da protease. É previsível que os inibidores da HMG-CoA redutase, tais como a lovastatina e a simvastatina, altamente dependentes da CYP3A4 para a sua metabolização, tenham um aumento marcado das suas concentrações plasmáticas, quando administrados com Telzir com ritonavir. Uma vez que o aumento das concentrações dos inibidores da HMG-CoA redutase podem causar miopatia, incluindo rabdomiólise, a associação destes fármacos a Telzir com ritonavir não é recomendada. Não são necessários ajuste na dose de fosamprenavir ou ritonavir quando administrados concomitantemente com atorvastatina. A Cmax , AUC e Cmin da atorvastatina aumentaram 184%, 153% e 73% respectivamente quando a atorvastatina (10 mg uma vez dia, durante 4 dias) foi administrada com 700 mg de fosamprenavir duas vezes dia com 100 mg de ritonavir 100 mg duas vezes dia, durante duas semanas. A C_{max}, AUC e C_{min} de amprenavir não foram alteradas. Quando utilizada com Telzir e ritonavir, não devem ser administradas doses de atorvastatina superiores a 20 mg/dia e deve proceder-se a monitorização cuidadosa relativamente à toxicidade da atorvastatina. Imunossupressores: recomenda-se monitorização frequente da concentração plasmática dos imunossupressores até estabilização dos níveis plasmáticos, uma vez que as concentrações plasmáticas de ciclosporina, rapamicina e tacrolimus podem aumentar, quando administradas concomitantemente com fosamprenavir com ritonavir. Antidepressivos tricíclicos: recomenda-se monitorização cuidadosa dos efeitos terapêuticos e reacções adversas dos antidepressivos tricíclicos (por ex. desipramina e nortriptilina) quando administrados concomitantemente com Telzir. *Medicamentos cujas concentrações plasmáticas podem ser diminuídas quando administrados concomitantemente com Telzir* Metadona: não existe informação disponível sobre a administração concomitante de fosamprenavir com ritonavir e metadona. O amprenavir e o ritonavir diminuem ambos as concentrações plasmáticas de metadona. Quando a metadona é administrada com Telzir com ritonavir, os doentes devem ser monitorizados quanto ao síndrome de abstinência de opióides, com monitorização concomitante dos níveis plasmáticos de metadona. Anticoagulantes orais: em caso de administração de Telzir com ritonavir com varfarina ou outro anticoagulante oral recomenda-se uma monitorização reforçada do *International Normalised Ratio*, devido ao possível aumento ou decréscimo do efeito antitrombótico. Anticoncepcionais orais: recomenda-se que as mulheres em idade fértil utilizem como alternativa métodos de contracepção de barreira seguros. Os estrogénios e os progestagénios podem interagir com o fosamprenavir e ritonavir, e por isso a sua utilização concomitante pode afectar a eficácia dos anticoncepcionais hormonais. **Gravidez e aleitamento** Gravidez Não existe experiência clínica de fosamprenavir em mulheres grávidas. Em estudos em animais expostos a concentrações sistémicas plasmáticas (AUC) de amprenavir, inferiores à exposição terapêutica em doentes tratados com Telzir, observou-se algum desenvolvimento de toxicidade. Tendo em conta a baixa exposição em estudos de toxicidade reprodutiva, o potencial de Telzir para desenvolver toxicidade não foi completamente determinado. Telzir só deve ser utilizado durante a gravidez se os potenciais benefícios justificarem os potenciais riscos para o feto. Aleitamento Foi detectado material relacionado com o amprenavir no leite de ratos fêmeas,

mas desconhece-se se o amprenavir é excretado no leite humano. As crias de rato expostos nos períodos pré e pós natal a amprenavir e fosamprenavir demonstraram desenvolvimento de toxicidade. Recomenda-se por isso que as mulheres em tratamento com Telzir não amamentem os seus filhos. Regra geral, recomenda-se que as mulheres infectadas pelo VIH não amamentem os seus filhos sob nenhuma circunstância, de modo a evitar a transmissão do VIH. **Efeitos sobre a capacidade de conduzir e utilizar máquinas** Não foram estudados os efeitos de Telzir em associação com ritonavir sobre a capacidade de conduzir ou utilizar máquinas. O perfil de reacções adversas de Telzir deve ser tido em consideração quando se considera a capacidade do doente em conduzir ou operar máquinas (ver Efeitos indesejáveis). **Efeitos indesejáveis** A segurança de fosamprenavir foi estudada em 755 doentes em ensaios clínicos controlados de Fase II e III. A segurança da administração concomitante de fosamprenavir com doses baixas de ritonavir foi estabelecida em dois ensaios clínicos de Fase III: - APV30002 (n = 322), administração de fosamprenavir (1400 mg) uma vez dia em associação com ritonavir (200 mg), como parte de um regime triplo incluindo abacavir e lamivudina, em doentes sem tratamento prévio com antirretrovíricos. APV30003, administração de fosamprenavir em associação com doses baixas de ritonavir, ambos uma vez dia, (1400 mg / 200 mg) (n = 106) ou duas vezes dia (700 mg/100 mg) (n = 106) em associação com dois inibidores activos da transcriptase reversa (ITRs), em doentes com tratamento prévio com inibidores da protease. O perfil de reacções adversas foi semelhante ao longo dos respectivos estudos: população de doentes sem tratamento prévio com antirretrovíricos (APV30002) e população de doentes com tratamento prévio com inibidores da protease (regime posológico duas vezes dia, APV30003). As reacções adversas estão listadas por classe de sistema de órgãos e frequência. A frequência é definida como: muito frequentes (≥ 1/100, < 1/10), frequentes (≥ 1/100, < 1/10), pouco frequentes (≥ 1/1000, < 1/100, raros (≥ 1/10000, < 1/1000) ou muito raros (< 1/10000), incluindo relatos isolados. A frequência das reacções foi calculada com base nas reacções adversas que foram, pelo menos, de intensidade moderada (Grau 2 ou superior) e notificadas pelos investigadores como atribuíveis à medicação utilizada nos estudos. Em baixo, encontram-se sumarizadas as reacções adversas clínicas mais frequentes (que ocorreram em pelo menos 1% dos doentes) notificadas nos dois estudos clínicos de maior dimensão em adultos, com pelo menos uma possível relação causal a Telzir.

Sistema de órgãos	Reacção adversa	Frequência
Doenças do sistema nervoso	Cefaleias, tonturas	Frequentes
Doenças gastrintestinais	Diarreia	Muito frequentes
	Fezes moles, náuseas, vómitos, dor abdominal	Frequentes
Afecções dos lecidos cutâneos e subcutâneas	Rash	Frequentes
Pertubações gerais e alterações no local de administração	Fadiga	Frequentes

Rash/reacções cutâneas: durante o tratamento pode ocorrer rash cutâneo, eritematoso ou maculopapular, com ou sem prurido. O rash resolve-se, geralmente, espontaneamente, sem necessidade de suspender o tratamento com fosamprenavir com ritonavir. O rash cutâneo grave ou com risco de vida, incluindo o síndrome de Stevens-Johnson, é raro, tendo sido relatado em menos de 1% dos doentes incluídos no programa de desenvolvimento clínico. O tratamento com fosamprenavir com ritonavir deverá ser permanentemente interrompido em caso de rash cutâneo grave ou em caso de rash de intensidade ligeira ou moderada acompanhado de sintomas sistémicos ou envolvimento das mucosas (ver Advertências e precauções especiais de utilização). Alterações bioquímicas: as alterações bioquímicas (Grau 3 ou 4) possivelmente relacionadas com o tratamento com fosamprenavir com ritonavir e notificadas em pelo menos 1% dos doentes incluem: aumento da ALT (*frequente*), da AST (*frequente*), da lipase sérica (*frequente*) e dos triglicéridos (*muito frequente*). Observou-se aumento dos valores de colesterol total de intensidade de Grau 3 ou 4 em menos de 1% dos doentes (< 1% APV 30002; 0% APV 30003).Lipodistrofia: a terapêutica de associação antirretrovírica tem sido associada a uma redistribuição da gordura corporal (lipodistrofia) em doentes infectados pelo VIH, incluindo a perda da camada adiposa subcutânea periférica e facial, aumento de tecido adiposo intra-abdominal e visceral, hipertrofia mamária e acumulação de gordura dorsocervical (nuca de búfalo) (ver Advertências e precauções especiais de utilização). Alterações metabólicas: a terapêutica de associação antirretrovírica tem sido associada a alterações metabólicas, tais como hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, resistência à insulina, hiperglicemia e hiperlactatemia (ver Advertências e precauções especiais de utilização). Hiperglicemia: tem sido relatado desenvolvimento de diabetes *mellitus*, hiperglicemia ou exacerbação de diabetes *mellitus* pré-existente em doentes tratados com inibidores da protease (ver Advertências e precauções especiais de utilização). Rabdomiólise: tem sido relatado com os inibidores da protease, mais especificamente em associação com análogos dos nucleósidos, um aumento da CPK, mialgia, miosite e, raramente, rabdomiólise. Doentes hemofílicos: tem sido relatado aumento da hemorragia espontânea em doentes hemofílicos tratados com inibidores da protease (ver Advertências e precauções especiais de utilização). **Sobredosagem** Não existe antídoto conhecido para Telzir. Não se sabe se o amprenavir pode ser removido por diálise peritoneal ou hemodiálise. Caso ocorra sobredosagem, o doente deve ser monitorizado quanto a evidência de toxicidade (ver Efeitos indesejáveis), procedendo-se ao tratamento de suporte padrão conforme necessário. **PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS Propriedades farmacodinâmicas** Grupo farmacoterapêutico: Antivíricos para uso sistémico, inibidor da protease, código ATC: J05A Mecanismo de acção O fosamprenavir é rapidamente convertido em amprenavir por fosfatases celulares ou séricas *in vivo*. O amprenavir é um inibidor competitivo da protease do VIH-1. O amprenavir bloqueia o local activo da protease VIH – 1, prevenindo assim a progressão da *gag* vírica e das poliproteínas precursoras *gag-pol*, resultando na formação de partículas víricas imaturas não infecciosas. O fosamprenavir tem pouca ou nenhuma actividade antivírica *in vitro*. A actividade antivírica observada *in vitro* com fosamprenavir deve-se à presença de vestígios de amprenavir. A actividade antivírica *in vitro* do amprenavir foi avaliada relativamente ao VIH-1 IIIB em linhas celulares de linfoblastos com infecção aguda e crónica (MT-4, CEM-CCRF, H9) e em linfócitos de sangue periférico. A concentração inibitória 50% (CI50) do amprenavir varia entre 0,012 a 0,08 µM em células com infecção aguda e foi de 0,41 µM em células cronicamente infectadas (1 µM = 0,50 µg/ml). *In vitro*, o amprenavir demostrou actividade anti-VIH sinérgica em associação com os inibidores nucleósidos da transcriptase reversa (INTR) abacavir, didanosina e zidovudina, e o inibidor da protease saquinavir, e actividade anti-VIH aditiva em associação com indinavir, nelfinavir e ritonavir. A relação entre a actividade anti-VIH-1 *in vitro* do amprenavir e a inibição da replicação de VIH-1 em humanos não foi definida. A administração concomitante de ritonavir com fosamprenavir aumenta em, aproximadamente, 2 vezes a AUC de amprenavir e a C_{ss} plasmática em 4 a 6 vezes, comparativamente aos valores obtidos quando o fosamprenavir é administrado isoladamente. A administração de 700 mg de fosamprenavir duas vezes dia com 100 mg de ritonavir duas vezes dia resulta em concentrações mínimas plasmáticas de amprenavir (média geométrica plasmática da C_{min} 1,74 µg/ml, relatada no estudo APV30003 em doentes sujeitos a terapêutica prévia com antirretrovíricos) acima do valor médio da IC50 relatada neste estudo (0,008 µg/ml [0,001 – 0,114]). Resistência Foram selecionados isolados de VIH-1 com sensibilidade diminuída ao amprenavir em experiências de passagem em série in *vitro*. A diminuição da sensibilidade ao amprenavir foi associada a vírus que desenvolveram mutações I50V, I84V, V32I+I47V ou I54M. Não se detectou desenvolvimento de resistência genotípica ou fenotípica ao amprenavir em trinta e dois doentes sem tratamento prévio com antirretrovíricos tratados com 1400 mg de fosamprenavir com 200 mg de ritonavir, uma vez dia (estudo APV30002) e que apresentavam falência virológica ou replicação viral activa. Uma quantidade significativamente mais elevada de doentes tratados com nelfinavir adquiriu mutações PRO primárias e/ou secundárias (nelfinavir 27/54 (50%)) (p< 0,001). Foi detectado desenvolvimento de resistência ao amprenavir em vírus isolados de doentes com tratamento prévio com inibidores da protease, a receber 1400 mg de fosamprenavir com 200 mg de ritonavir, uma vez dia, ou 700 mg de fosamprenavir com 100 mg de ritonavir, duas vezes dia (estudo APV30003) e que apresentavam falência virológica ou replicação viral activa. 58% (19/33) versus 25% (7/28) dos doentes adquiriu mutações PRO primárias e/ou secundárias no braço fosamprenavir com ritonavir versus o braço lopinavir / ritonavir. As seguintes mutações associadas a resistência ao amprenavir desenvolveram-se individualmente ou em associação: V32I, M46I/L, I47V, I50V, I54L/M e I84V. Resistência cruzada A informação actual é demasiado limitada para determinar um fenotipo clinicamente relevante para o fosamprenavir com ritonavir. Não é provável que ocorra resistência cruzada entre amprenavir e os inibidores da transcriptase reversa, uma vez que os alvos enzimáticos são diferentes. Telzir não é recomendado para utilização em monoterapia, devido ao rápido aparecimento de vírus resistentes. Experiência clínica A experiência clínica baseia-se essencialmente em dois estudos abertos realizados em comparação com nelfinavir em doentes sem tratamento prévio com antirretrovíricos (estudo APV30002) e em comparação com lopinavir/ritonavir em doentes com tratamento prévio com antirretrovíricos (estudo APV30003). Em ambos os estudos, o fosamprenavir foi utilizado conjuntamente com ritonavir. Doentes sem Tratamento Prévio com Antirretrovíricos Nos doentes sem tratamento prévio com antirretrovíricos no estudo APV30002, a administração uma vez dia de fosamprenavir (1400 mg) com baixas doses de ritonavir (200 mg), como parte de um regime triplo incluindo abacavir (300 mg, duas vezes dia) e lamivudina (150 mg, duas vezes dia), demonstrou eficácia semelhante passadas 48 semanas, comparativamente a nelfinavir (1250 mg) administrado duas vezes dia em associação com abacavir com lamivudina (300 e 150 mg, duas vezes dia). Foi demonstrada não-inferioridade entre fosamprenavir com ritonavir e nelfinavir com base na proporção de doentes que atingiram níveis plasmáticos de ARN VIH-1 < 400 cópias/ml à semana 48 (parâmetro de avaliação clínica primário). Na análise da Intenção de Tratar (Recidiva ou Descontinuação = Falência), 69% (221/322) dos doentes a tomar fosamprenavir com ritonavir atingiram < 400 cópias/ml comparativamente a 68% (221/327) dos doentes a receber nelfinavir. A concentração média plasmática do ARN VIH-1 diminuiu entre 3,1 log_{10} cópias/ml e 3,0 log_{10} cópias/ml à semana 48, nos braços fosamprenavir com ritonavir e nelfinavir, respectivamente. O número médio basal de células CD4 era baixo em ambos os grupos (170 células/mm^3) no geral). O número de células CD4 aumentou de modo similar relativamente à magnitude nos dois grupos, fosamprenavir com ritonavir e nelfinavir, com aumentos medianos acima dos valores basais, na semana 48 (+ 203 e + 207 células/mm^3, respectivamente). A informação acima descrita demonstra que o regime uma vez dia de fosamprenavir com ritonavir (1400 / 200 mg uma vez dia) em doentes sem tratamento prévio com antirretrovíricos, demonstra eficácia semelhante comparativamente a nelfinavir administrado duas vezes dia. No entanto, a demostração de eficiência nesta população baseia-se apenas num estudo aberto versus nelfinavir. Está planeado outro estudo clínico para reforçar a eficácia do medicamento nesta população. Assim, numa abordagem conservadora, baseada nos níveis de amprenavir C_{vale}, recomenda-se um regime posológico de duas vezes dia de fosamprenavir com ritonavir para o controlo terapêutico óptimo nesta população (ver Posologia e modo de administração). Doentes Sujeitos a Tratamento Prévio com Antirretrovíricos Num estudo aberto randomizado (APV30003), realizado em doentes com falência virológica com terapêutica prévia com inibidores da protease (com dois ou menos IP) a associação fosamprenavir com ritonavir (700/100 mg duas vezes dia ou 1400/200 mg uma vez dia) não demonstrou ser não inferior a lopinavir/ritonavir relativamente à supressão viral, como avaliado pela média da área sob a curva (AAUCMB) menos os valores iniciais, do ARN VIH-1 plasmático passadas 48 semanas (parâmetro de avaliação clínica primário). Os resultados foram favoráveis ao braço lopinavir/ritonavir como detalhado abaixo. Todos os doentes neste estudo apresentaram falência terapêutica com um regime prévio de inibidores da protease (definido como ARN VIH-1 plasmático que nunca diminuiu de 1.000 cópias/ml após, pelo menos, 12 semanas consecutivas de terapêutica, ou supressão inicial de ARN VIH-1 com subsequente retorno a ≥ 1.000 cópias/ml). Contudo, apenas 65% dos doentes estavam a tomar IP como regime base à entrada do estudo. A população incluída consistiu principalmente em doentes sujeitos a tratamento moderado prévio com antirretrovíricos. A duração média de exposição prévia a INTRs foi de 257 semanas para os doentes a receber fosamprenavir com ritonavir duas vezes dia (79% foram previamente expostos a ≥ 3 INTRs) e 210 semanas para os doentes a receber lopinavir/ritonavir (64% foram previamente expostos a ≥ 3 INTRs). A duração média de exposição prévia a inibidores da protease foi de 149 semanas para os doentes a receber fosamprenavir com ritonavir duas vezes dia (49% receberam mais que 2 IP, previamente) e 130 semanas para os doentes a receber lopinavir/ritonavir (40% receberam mais que 2 IP, previamente). As médias da AAUCMBs (log_{10} c/ml) na população ITT (E) (análise observacional) às 48 semanas estão descritas na tabela abaixo:**Valores da média da Área sob a Curva menos valores iniciais (AAUCMB) do ARN VIH-1 plasmático (log_{10} cópias/ml) na semana 48, por Estrato Randomisado na População ITT (E) no APV30003 (Análise Observacional)**

Estrato de ARN VIH-1 plasmático [1]	Análise observacional FOS/RTV BID N=107 Média (n)	Análise observacional LPV/RTV BID N=103 Média (n)	Análise observacional Dif. Média (97.5% IC) FOS/RTV BID vs LPV/RTV BID
1000 – 10.000 cópias/ml	-1,53 (41)	-1,43 (43)	-0,104 (-0,550, 0,342)
> 10.000 – 100.000 cópias/ml	-1,59 (45)	-1,81 (46)	0,216 (-0,213, 0,664)
> 100.000 cópias/ml	-1,38 (19)	-2,61 (14)	1,232 (0,512, 1,952)
População total	-1,53 (105)	-1,76 (103)	0,244 (-0,047, 0,536)

Chave: FOS/RTV BID – Fosamprenavir com ritonavir, duas vezes dia, LPV/RTV BID – Lopinavir/ritonavir, duas vezes dia. Ao considerar a proporção de doentes com carga viral indetectável nos braços fosamprenavir com ritonavir em regime posológico de duas vezes dia e lopinavir / ritonavir, respectivamente, os resultados demonstram uma tendência a favor dos braços lopinavir / ritonavir: 58% versus 61% (ARN VIH-1 plasmático < 400 cópias/ml) ou 46% versus 50% (ARN VIH-1 plasmático < 50 cópias/ml) à semana 48 (parâmetro de avaliação clínica secundário) na análise intenção de tratar (RD=F). Nos doentes com elevada carga viral no início do estudo (> 100.000 cópias/ml), 7/14 (50%) dos doentes no grupo lopinavir / ritonavir e 6/19 (32%) dos doentes no grupo fosamprenavir com ritonavir tiveram concentração plasmática de ARN VIH-1 < 400 cópias/ml. O regime duas vezes dia de fosamprenavir com ritonavir e o regime duas vezes dia de lopinavir/ritonavir demostraram melhoria imunológica idêntica na semana 48 de tratamento, como avaliado pela alteração média do número de células CD4+ relativamente ao número inicial (fosamprenavir com ritonavir duas vezes dia: 81 células/mm^3; lopinavir/ritonavir duas vezes dia: 91 células/mm^3). Não existem dados suficientes para recomendar a utilização de fosamprenavir com ritonavir em doentes com terapêutica altamente potente prévia.**Propriedades farmacocinéticas** Após administração oral, o fosamprenavir é rápida e quase completamente hidrolisado em amprenavir e fosfato inorgânico, antes de entrar na circulação sistémica. A conversão do fosamprenavir em amprenavir parece ocorrer principalmente no epitélio intestinal. As propriedades farmacocinéticas do amprenavir, após administração de Telzir com ritonavir, foram avaliadas em indivíduos adultos saudáveis e em doentes infectados pelo VIH, não se tendo observado diferenças substanciais entre estes dois grupos. A administração em jejum de Telzir comprimidos e suspensão oral, origina valores de AUC_∞ de amprenavir plasmático equivalentes, e Telzir suspensão oral origina uma C_{max} de amprenavir 14% mais elevada comparativamente à formulação oral de comprimidos. **Absorção** O pico das concentrações plasmáticas de amprenavir observa-se aproximadamente 2 horas após administração de dose única de fosamprenavir. Em geral, os valores de AUC de fosamprenavir são inferiores a 1% dos valores observados para amprenavir. A biodisponibilidade absoluta do fosamprenavir em humanos não foi estabelecida. Após administração oral de doses múltiplas equivalentes de fosamprenavir e amprenavir, observaram-se valores de AUC comparáveis, no entanto, os valores de C_{max} foram aproximadamente 30% inferiores e os de C_{min} 28% superiores, com fosamprenavir. Após administração oral de doses múltiplas de 700 mg de fosamprenavir com 100 mg de ritonavir, duas vezes dia, o amprenavir foi rapidamente absorvido com uma média geométrica (95% IC) do pico das concentrações plasmáticas do amprenavir no estado de equilíbrio (C_{max}) de 6,08 (5,38-6,86) µg/ml, ocorrendo aproximadamente 1,5h (0,75-5,0) após ingestão da dose (t_{max}). A média plasmática no estado de equilíbrio das concentrações mínimas de amprenavir (C_{min}) foi 2,12 (1,77-2,54) µg/ml e a AUC_{0-tau} foi 39,6 (34,5-45,3) h*.µg/ml. A administração de fosamprenavir em comprimidos com uma refeição rica em gordura não alterou a farmacocinética plasmática de amprenavir (C_{max}, t_{max} ou $AUC_{0-\infty}$), comparativamente à administração desta formulação em jejum. Telzir comprimidos pode ser administrado independentemente da ingestão de alimentos. A administração concomitante de amprenavir com sumo de uva não foi associada a alterações clínicas significativas na farmacocinética plasmática do amprenavir. Distribuição O volume aparente de distribuição de amprenavir após administração de Telzir é de aproximadamente 430 litros (6 l/kg, considerando 70 kg de peso corporal), sugerindo um elevado volume de distribuição com livre penetração de amprenavir nos tecidos, superior à circulação sistémica. Este valor diminui aproximadamente 40% quando Telzir é administrado concomitantemente com ritonavir, provavelmente devido a um aumento da biodisponibilidade de amprenavir. Nos estudos in vitro, o amprenavir apresentou uma ligação às proteínas de aproximadamente 90%. Liga-se principalmente à glicoproteína ácida alfa-1 (GAA), e à albumina. As concentrações de GAA diminuíram durante o decurso da terapêutica antirretrovírica. Esta alteração provocará diminuição da concentração plasmática total de substância activa, no entanto, é provável que a quantidade de amprenavir livre, forma activa, não seja alterada. A penetração de amprenavir no líquido cefalorraquidiano é negligenciável. O amprenavir parece penetrar no esperma, embora a sua concentração seminal seja inferior à concentração plasmática. Metabolismo Após administração oral, o fosamprenavir é rápida e quase completamente hidrolisado em amprenavir e fosfato inorgânico, sendo absorvido pelo epitélio intestinal. O amprenavir é principalmente metabolizado pelo fígado, sendo menos de 1% excretado na urina. A principal via metabólica é através da enzima CYP3A4 do citocromo P450. O metabolismo do amprenavir é inibido pelo ritonavir, por inibição da CYP3A4, resultando num aumento das concentrações plasmáticas de amprenavir. O amprenavir é também um inibidor da enzima CYP3A4, embora em menor extensão que o ritonavir. Assim, medicamentos indutores, inibidores ou substratos da CYP3A4 devem ser utilizados com precaução quando administrados concomitantemente com Telzir com ritonavir (ver Contra-indicações e Interacções medicamentosas e outras formas de interacção). Eliminação Após administração de Telzir, o tempo de semi-vida do amprenavir é de 7,7 horas. Quando Telzir é administrado concomitantemente com ritonavir, o tempo de semi-vida do amprenavir aumenta para 15-23 horas. A principal via de eliminação do amprenavir é por metabolização hepática sendo menos de 1% excretado inalterado na urina, não se detectando amprenavir nas fezes. Os metabolitos representam aproximadamente 14% da dose administrada de amprenavir excretada na urina, e aproximadamente 75% nas fezes. Populações especiais. Pediatria A farmacocinética do fosamprenavir com ritonavir não foi estudada nos doentes pediátricos Idosos. A farmacocinética do fosamprenavir com ritonavir não foi estudada em doentes de idade superior a 65 anos. Insuficiência renal Não foram especificamente estudados doentes com insuficiência renal. Menos de 1% da dose terapêutica de amprenavir é excretada na urina na forma inalterada. A clearance renal do ritonavir é também negligenciável; assim, o impacto da insuficiência renal na eliminação de amprenavir e ritonavir deverá ser mínimo. Insuficiência hepática O fosamprenavir é convertido no homem em amprenavir. A principal via de eliminação do amprenavir e ritonavir é por metabolização hepática. Os dados relativos à utilização desta associação em doentes com insuficiência hepática são limitados, pelo que não se pode recomendar uma posologia específica (ver Contra-indicações e Advertências e precauções especiais de utilização). **INFORMAÇÕES FARMACÊUTICAS**
Lista de excipientes Núcleo do comprimido: Celulose microcristalina, Crescarmelose sódica, Povidona K30, Estearato de magnésio, Sílica coloidal anidra. Revestimento do comprimido: Hipromelose, Dióxido de titânio (E171) Triacetato de glicerilo, Óxido de ferro vermelho (E172). **TITULAR DA AUTORIZAÇÃO DE INTRODUÇÃO NO MERCADO** Glaxo Group Ltd Greenford Road Greenford Middlesex UB6 0NN Reino Unido
NÚMEROS DA AUTORIZAÇÃO DE INTRODUÇÃO NO MERCADO Embalagem de 60 comprimidos Nº Registo U.E. EU/1/04/282/001 Código Nacional 5145081
DATA DA PRIMEIRA AIM: 17 Julho 2004 **DATA DA REVISÃO DO TEXTO:** Julho 2004

BOLSA DE ESTUDO 04

Prof. Doutor Carvalho Araújo

Abbott Virologia

A Sociedade Portuguesa de Doenças Infecciosas (SPDI), com o apoio de Abbott Laboratórios, Lda., instituiu uma Bolsa de Estudo anual, no valor de 10.000 Euros (dez mil euros), destinada a subsidiar um projecto de investigação ou um estágio de formação na área das Doenças Infecciosas ou da Microbiologia Clínica.

O projecto de investigação ou o estágio de formação poderão desenvolver-se num Centro nacional ou estrangeiro.

As condições de candidatura à Bolsa são:

1. Ser sócio, com pelo menos um ano de filiação da SPDI.
2. Ser de nacionalidade portuguesa.
3. Ter formação devidamente comprovada na área das Doenças Infecciosas ou da Microbiologia Clínica.
4. Ter o aval do responsável pelo Centro ou Instituição onde o candidato exerce as suas funções, que certificará ainda a sua capacidade e formação.
5. Ter o aval do responsável pelo Centro ou Instituição onde o candidato pretende desenvolver o seu projecto de investigação ou o estágio de formação.
6. As candidaturas deverão ser apresentadas à Direcção da SPDI até 30 de Setembro do ano a que dizem respeito, devendo a decisão de atribuição ser comunicada até 31 de Outubro seguinte.
7. A decisão será da competência da Direcção da SPDI, tendo o Presidente voto de desempate. O júri poderá, contudo, solicitar parecer a outras personalidades, conquanto sem direito a voto. Nenhum dos membros do júri poderá candidatar-se à atribuição da Bolsa.
8. A atribuição da Bolsa Prof. Doutor Carvalho Araújo só poderá beneficiar uma única candidatura.

Abbott Virologia
Da Pesquisa à Realidade

ABBOTT LABORATÓRIOS, LDA
Rua Cidade de Cordova 1A Alfragide • 2610-038 Amadora
Tel 21 472 71 00 • Fax 21 471 44 82
Capital Social: 7 386 850 Euros • Nº Pessoa Colectiva 500 006 148
Reg Cons Reg C Amadora nº 1840

SOCIEDADE PORTUGUESA DE DOENÇAS INFECCIOSAS

VERTEX

gsk GlaxoSmithKline

Posso começar as aulas de ténis

Posso candidatar-me àquele novo emprego

Posso assistir ao nascimento do meu sobrinho

Posso continuar a ser eu próprio

Agora...

Posso iniciar com êxito uma terapêutica combinada

Posso obter uma resposta terapêutica mantida

Posso oferecer uma posologia realmente cómoda

Posso manter futuras opções de tratamento

Agora...



...juntos com telzir

nós podemos

telzir® fosamprenavir

Right from the start

Medicamento sujeito a receita médica restrita
GlaxoSmithKline • Rua Dr. António Loureiro Borges, nº 3 • Arquiparque - Miraflores • 1495-131 Algés
Para mais informação contactar o Departamento Médico da GlaxoSmithKline • Tel.: 21 412 95 00