

Monitoramento epidemiológico de carrapatos em área de risco para Febre Maculosa Brasileira, Americana – SP

Epidemiological monitoring of ticks in public woods in a risk area for Brazilian Spotted Fever

José Brites-Neto^{1,II}, Jardel Brasil^I

¹Secretaria de Saúde de Americana, SP; ^{II}Departamento de Ciências Exatas/ESALQ/USP

RESUMO

A importância da Febre Maculosa Brasileira (FMB) aumentou significativamente, pela crescente relação do número de casos e óbitos diagnosticados e elevada taxa de letalidade em São Paulo entre 2000 e 2009, agravada pela expansão das áreas de transmissão, com modificação nas características ecoepidemiológicas e ocorrência de casos em áreas urbanas e periurbanas. Este informe apresenta resultados do monitoramento de um bosque público no município de Americana/SP onde, na ausência de hospedeiros amplificadores de rickettsias (capivaras) por meio de controle estabelecido e após dois anos de monitoramento por pesquisas acarológicas, modificou-se o *status* epidemiológico desta área infestada por carrapatos e de risco epidemiológico para FMB para área não infestada e livre para frequência humana, com nulidade de parasitismo humano por *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum*.

PALAVRAS-CHAVE: Rickettsia. Capivaras. *Amblyomma cajennense*. *Amblyomma dubitatum*. Vigilância acarológica.

ABSTRACT

The importance of Brazilian Spotted Fever (BSF) increased significantly by the increasing ratio of cases and deaths diagnosed and high mortality rate in São Paulo between 2000 and 2009, exacerbated by the expansion of the transmission areas, with modification on ecological and epidemiological characteristics and the occurrence of cases in urban and suburban areas. This paper presents results of monitoring a public forest in the city of Americana/SP where, in the absence of amplifying hosts of rickettsia (capybara) through established control and after two years of monitoring by acarological research, changed the epidemiological status of the area infested by ticks and epidemiological risk for BSF to non-infested area and free for human frequency, with the nullity of human parasitism by *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dubitatum*.

KEYWORDS: Rickettsia. Capybaras. *Amblyomma cajennense*. *Amblyomma dubitatum*. Surveillance.

INTRODUÇÃO

A Febre Maculosa Brasileira (FMB) é uma antroponose de notificação compulsória com incidência e prevalência associadas ao risco para o parasitismo humano, baixa morbidade para a população humana do estado de São Paulo e características epidemiológicas de elevada endemicidade e alta letalidade na Região Metropolitana de Campinas,¹ onde está inserido o município de Americana/SP. De 2004 a 2012 foram confirmados dez casos de FMB em Americana/SP, com uma taxa de letalidade de 60%.²

O seu agente etiológico (*Rickettsia rickettsii*) apresenta grande patogenicidade e

variabilidade genética³ e embora determine baixa morbimortalidade na população, talvez seja o agente etiológico mais letal para os humanos depois do vírus rábico.⁴

Essa configuração demonstra que uma vigilância epidemiológica e laboratorial para confirmação de casos prováveis é extremamente importante, na medida em que o controle dessa enfermidade será mais eficiente, quanto mais informações forem obtidas de indivíduos expostos a carrapatos.⁵

A FMB é uma doença infecciosa aguda, de gravidade variável, na qual os homens são

hospedeiros acidentais, não sendo considerados reservatórios da doença e não colaborando com a propagação do agente. É caracterizada por um período de incubação de 2 a 14 dias, febre contínua, calafrios, prostração, mal-estar, mialgia, artralgia, cefaleia, erupções cutâneas máculo-papulares e distúrbios hemostáticos. Com taxas de mortalidade no Brasil girando em torno de 20 a 30%, em função das dificuldades diagnósticas e de estabelecimento de uma terapia apropriada e precoce, consignadas ao pouco conhecimento sobre sua patogenia e à sintomatologia pouco específica, sua letalidade pode chegar a 80%, nos casos não tratados.⁶

Entre 2000 e 2013, a importância da FMB enquanto agravo em Saúde Pública aumentou significativamente. Fato justificado pela crescente relação dos números de casos e óbitos diagnosticados, respectivamente 545 e 238, em São Paulo; 167 e 69, em Minas Gerais; 49 e 11, no Espírito Santo; 77 e 30, no Rio de Janeiro,^{7,8} somado às elevadas taxas de letalidade (44% em São Paulo; 41% em Minas Gerais; 22% no Espírito Santo e 39% no Rio de Janeiro) e agravado pela expansão das áreas de transmissão, que não se restringiram mais às áreas rurais e de mata. A ocorrência de casos (em áreas urbanas e periurbanas) demonstra profunda modificação nas características ecoepidemiológicas dessa doença.

Desde 2006, o Programa de Vigilância e Controle de Carrapatos (PVCC) realiza atividades em áreas de risco para FMB na região hidrográfica de Americana, composta por matas ciliares do Ribeirão Quilombo, dos Rios Piracicaba, Jaguari e Atibaia e da Represa do Salto Grande, onde está localizado o Bosque das Nascentes. Nestas áreas de risco epidemiológico para FMB, este programa estabeleceu atividades de monitoramento por meio de pesquisas

acarológicas, sob supervisão da Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN, regional de Campinas/SP, considerando que em região com potencial biótico de desenvolvimento da doença, o diagnóstico epidemiológico é determinado pelas condições socioeconômicas da população, pela distribuição e densidade dos vetores transmissores (influenciada por fatores climáticos e ambientais), pelas condições ecológicas locais e pelas espécies domésticas (equídeos e cães) e silvestres (principalmente capivaras) presentes.⁹

O aumento das populações de capivaras, em pequenas matas ciliares ou em fragmentos florestais de lagos e represas (que caracterizam áreas de proteção ambiental em unidades de produção agropecuária), associa-se aos níveis insuportáveis de infestações ambientais por carrapatos das espécies *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum*. Os seres humanos e animais domésticos em tais sítios são expostos permanentemente ao parasitismo e ao risco de doenças transmitidas por carrapatos, como a Febre Maculosa.¹⁰

Esta situação sempre constituiu alvo de preocupações em Saúde Pública para o Bosque das Nascentes, caracterizado como uma área de bosque com um lago artificial abastecido por água de nascente (Figura 1), onde o parasitismo humano por carrapatos foi frequente em crianças pertencentes a uma população de 28.400 moradores residente em suas imediações no bairro Antonio Zanaga. Essa área de pesquisa acarológica frequentada como área de lazer por 350 visitantes diários está localizada em região com forte evidência de risco para FMB (próxima ao Rio Piracicaba e Rio Jaguari), onde durante as atividades de monitoramento foi observada a presença de capivaras, gambás, coelhos, aves domésticas e aves silvestres.



Figura 1. Bosque das Nascentes, mostrando área de bosque público com lago artificial dentro de perímetro urbano

METODOLOGIA

De maio de 2009 a maio de 2013, o PVCC objetivou monitorar ativamente esta área de risco do Bosque das Nascentes realizando pesquisas acarológicas periodicamente, por meio dos métodos de armadilha de dióxido de carbono (CO_2 , gelo seco) e arrasto, com a concomitante retirada de capivaras deste local, sob licença de captura emitida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – Ibama. Foram utilizados os critérios preconizados pela Sucen, para classificação de áreas epidemiológicas em trabalhos de vigilância da FMB, em que a técnica utilizada¹¹ foi empregada em pontos distintos do bosque, onde foram colocados 800 gramas de cubos de gelo seco em uma depressão rasa no solo e, acima desta, uma flanela branca medindo 1,0 m x 1,0 m com fita adesiva dupla face de 1 cm de largura, fixada nas bordas e nos quatro lados da flanela. O tempo de permanência de cada armadilha foi de uma hora. Os carrapatos

de vida livre foram coletados por armadilhas de CO_2 , mediante equipe de quatro capturadores devidamente paramentados por Equipamentos de Proteção Individual (EPIs). As coletas foram realizadas das 9 às 12h,¹² nos meses de maio, julho, agosto, setembro, outubro, novembro e dezembro de 2009; janeiro, fevereiro, março, abril, maio, junho, setembro e novembro de 2010; março, julho, setembro e novembro de 2011; abril, julho e novembro de 2012; e maio de 2013.

Os carrapatos adultos coletados foram identificados segundo chaves dicotômicas modificadas;¹³ as larvas foram identificadas mediante critérios morfológicos, sendo diferenciadas quanto ao maior tamanho corporal e seu contorno mais ovalado em *Amblyomma dubitatum*, em comparação com *Amblyomma cajennense*¹⁴ e as ninfas caracterizadas pela chave taxonômica para espécies de *Amblyomma*.¹⁵

Os exemplares adultos das espécies *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* foram acondicionados em microtubos de 1,5 mL, e conservados a -80°C para extração de DNA e análise pela PCR. Cada carrapato adulto foi descongelado e submetido ao processo de dissecação e remoção das glândulas salivares, conservadas em tubos de 2 mL tipo “ependorf” com 30 a 50 mL de TE (Tris HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 7,4). As amostras de glândulas salivares foram submetidas à extração de DNA, por meio do protocolo GT (clorofórmio e isotiocianato de guanidina) e testadas pela PCR usando primers CS-62/CS-462, para um fragmento de 401pb do gene citrato sintase de *Rickettsia* spp. (gltA),¹⁶ sendo as amostras positivas para gltA-PCR também testadas por uma segunda PCR, usando primers Rr190.70/Rr190.602 para um fragmento de 532pb do gene da membrana externa da proteína A de *Rickettsia* (ompA), específico para o Grupo da Febre Maculosa.¹⁷

A visualização dos resultados da PCR foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, com coloração em

brometo de etídio e leitura em transiluminador ultravioleta. Após confirmação de positividade da amostra pela PCR, o material amplificado foi purificado utilizando-se o produto ExoSAP-IT® (USB® Corporation) e submetido ao sequenciamento utilizando o “Kit Big Dye 3.1” em sequenciador de DNA modelo ABI “Prism 3100 Genetic Analyser” (Applied Biosystems/Perkin Elemer®). As sequências obtidas foram submetidas ao programa “BLAST analysis” para determinar similaridades com outras espécies de riquetsias.¹⁸

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vários trabalhos de monitoramento de riscos para FMB em parques públicos com retirada de capivaras foram preconizados em nossa região, suscitando polêmicas junto à sociedade.¹⁹⁻²² Dois anos após a retirada de capivaras a infestação por *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* foi anulada (Figuras 2 e 3), concordando com resultados de outra área endêmica no estado de São Paulo.²³

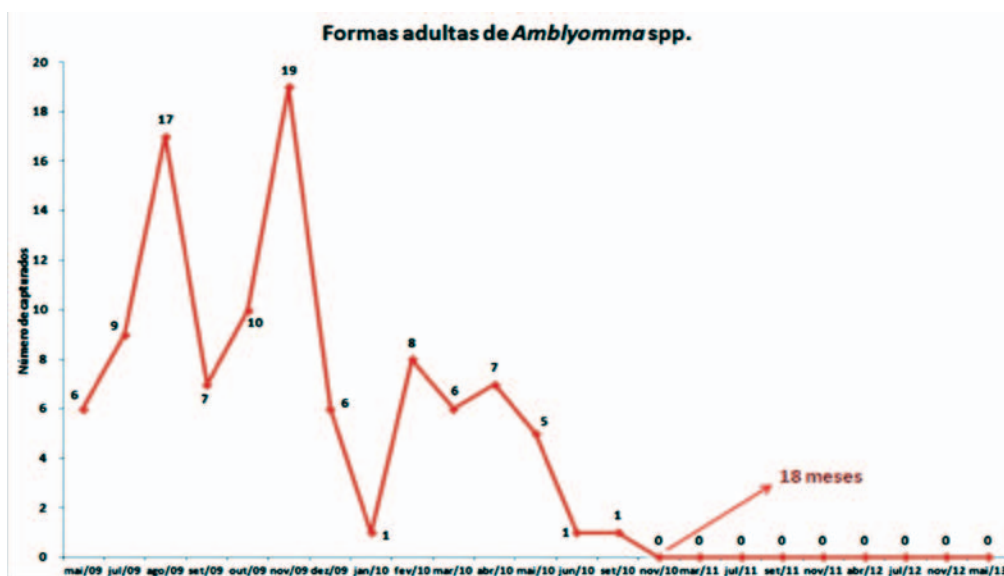


Figura 2. Resultado das pesquisas acarológicas para formas adultas de *Amblyomma* spp., Bosque das Nascentes, Americana-SP, 2009-2013.

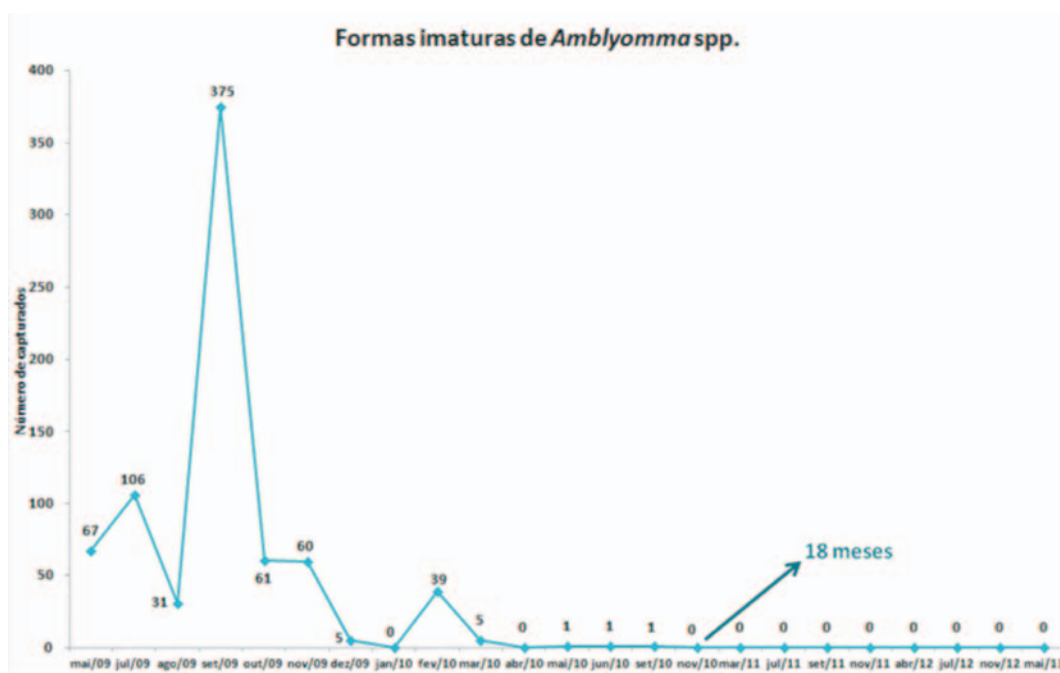


Figura 3. Resultado das pesquisas acarológicas para formas imaturas de *Amblyomma* spp, Bosque das Nascentes, Americana/SP, 2009-2013.

Mediante 23 pesquisas acarológicas realizadas no período de 2009 a 2013, foram coletados e identificados 448 espécimes de *Amblyomma cajennense*, sendo 47 adultos (22 machos e 25 fêmeas), 370 ninfas e 31 larvas e 407 espécimes de *Amblyomma dubitatum*, sendo 56 adultos (26 machos e 30 fêmeas), 264 ninfas e 87 larvas. Foram dissecadas 103 amostras de carrapatos adultos para remoção de glândulas salivares para extração de DNA e avaliação por gItA-PCR, com resultados por espécie de 1,79% (1/56) de amostras positivas de *Amblyomma dubitatum* e nenhuma amostra positiva de *Amblyomma cajennense* (0/47). Foi realizada pesquisa de rickettsias pelo teste da hemolinfa em 46 amostras procedentes de pesquisas acarológicas com resultado de 4 (8,7%) carrapatos contendo estruturas indicativas de *Rickettsia* spp., e por meio de resultados de PCR índices de 0,97% (1/103) de amostras positivas para gItA-PCR

e negativas para ompA2-PCR, não indicando infectividade para rickettsias do grupo da Febre Maculosa.

A amostra positiva de *Amblyomma dubitatum* para gItA-PCR foi analisada pela ompA2-PCR, sendo negativa e submetida ao sequenciamento de DNA, em que a sequência obtida mostrou 100% de similaridade com *Rickettsia bellii* no GenBank.

Esses resultados indicaram que patógenos transmitidos por carrapatos não estão limitados somente às áreas rurais ou periféricas urbanas, de forma similar ao estudo em que foram coletados 273 carrapatos (255 *Amblyomma americanum* e 18 *Dermacentor variabilis*) de dois parques urbanos em Little Rock, AR, para avaliar a presença de rickettsias e erlichias dentro de uma área urbana.²⁴ Enquanto nenhuma amostra de *D. variabilis* foi positiva, quarenta e duas amostras

(98%) de *A. americanum* demonstraram evidência molecular para a presença de rickettsias. A análise por RFLP e o sequenciamento de DNA revelaram *Rickettsia amblyommii* como a espécie presente.

CONCLUSÕES

Os resultados do trabalho de monitoramento do Bosque da Nascente, na ausência de hospedeiros amplificadores de rickettsias (capivaras), assim como demais hospedeiros primários e secundários para espécies de *Amblyomma*, durante dois anos de vigilância acarológica estabelecida, permitiram modificar o *status* epidemiológico desta área infestada e de risco epidemiológico para Febre Maculosa Brasileira para área não infestada e de livre frequência humana, com nulidade para parasitismo humano por *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum*.

A proibição rigorosa de frequência e da introdução de quaisquer espécies de animais domésticos, exóticos ou silvestres em áreas de circulação do bosque, a manutenção permanente das cercas limítrofes desta área e a manutenção periódica dos gramados e vegetações arbustivas do Bosque das Nascentes foram medidas preconizadas como protocolos permanentes de manejo de rotina pós-monitoramento.

AGRADECIMENTOS:

Ao Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna e Profa. Dra. Fernanda Aparecida Nieri-Bastos, pelo apoio conferido nas análises moleculares realizadas no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo-SP.

REFERÊNCIAS

1. Pinter A, França AC, Souza CE, Sabbo C, Nascimento EMM, Santos FCP, Labruna MB, Holcman MM, Alves MJCP, Horta MC, Mascheretti M, Mayo RC, Angerami RN, Brasil RA, Souza SSAL, Colombo S, Oliveira VLM. Febre Maculosa Brasileira. BEPA Suplemento. 2011; 8(1):1-31.
2. Brites-Neto J, Nieri-Bastos FA, Brasil J, Duarte KMR, Martins TF, Verissimo CJ, Barbieri ARM, Labruna MB. Environmental infestation and rickettsial infection in ticks in a Brazilian spotted fever-endemic area. Rev Bras Parasitol Vet. 2013; 22(3):367-72.
3. Parola P, Labruna MB, Raoult D. Tick-borne rickettsioses in America: Unanswered questions and emerging diseases. Current Infectious Disease Reports. 2009; 11(1):40-50.
4. Ferreira AA. Carrapatos em roedores da região de Franca/SP: avaliação preliminar do potencial de transmissão de doenças infecciosas para a população humana [dissertação de mestrado]. Franca: Universidade de Franca; 2006.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. 7.ed. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2009.
6. Del Fiol FS et al. A febre maculosa no Brasil. Rev Panam Salud Publica. 2010; 27(6):461-466.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Casos confirmados de Febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1997 a 2014. [Acesso em 10 jun. 2014]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/26/anexo-FebreMaculosa.pdf>.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Óbitos de Febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2014. [Acesso em 10 jun. 2014]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/26/anexo-2-FebreMaculosa.pdf>.

9. Peterka CRL. Avaliação do efeito da fragmentação florestal na diversidade de carrapatos e patógenos transmitidos por carrapatos na região do Pontal do Paranapanema, SP [dissertação de mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.
10. Szabó MPJ. Aspects of tick ecology in natural and anthropized environment of Brazil. In: International Congress of Acarology, 13 Aug 2010; Recife, BR. Recife: Abstract Book; 2010. p. 271.
11. Wilson JG, Kinzer DR, Sauer JR, Hair JA. Chemo-attraction in the lone star tick (Acarina: Ixodidae). I. Response of different developmental stages to carbon dioxide administered via traps. *J. Med. Entomol.* 1972; 9(3):245-52.
12. Souza SSAL. Ecologia e técnicas de amostragem de ixodídeos em áreas endêmicas para febre maculosa brasileira na região de Campinas, SP [dissertação de mestrado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2003.
13. Onofrio VC, Labruna MB, Pinter A, Giacomini FG, Barros-Battesti DM. Comentários e chaves para as espécies do gênero *Amblyomma*. In: Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH. Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan; 2006. p. 53-71.
14. Brites-Neto J. Diagnóstico epidemiológico de infectividade para *Rickettsia rickettsii* em *Amblyomma* spp. no Município de Americana, SP [dissertação de mestrado]. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia; 2011.
15. Martins TF, Onofrio VC, Barros-Battesti DM, Labruna MB. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescriptions, and identification key. *Ticks and Tick-borne Diseases.* 2010; 1(2):75-99.
16. Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, Pinter A, Popov V, Gennari SM, Walker DH. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, Brazil, where Brazilian Spotted Fever is endemic. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(1):90-8.
17. Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *Journal Bacteriology.* 1991; 173(5):1576-89.
18. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology.* 1990; 215:403-10.
19. Nasser JT, Feltrin LH, Lana RC, Dias CM. A retirada de capivaras de parques públicos de Valinhos, SP. In: I Simpósio Estadual de Doenças Transmitidas por Carrapatos; 24-26 Jun 2009; Campinas, BR. São Paulo: Núcleo de Comunicação da Coordenadoria de Controle de Doenças - CCD; 2009; Suplemento Bepa 6(8):11.
20. Chiebao DP, Nogueira AHC, Carvalho S, Pinter A, Botelho MR, Silva GEA, Gabriel FHK, Labruna MB. Avaliação da circulação de riquetsias em carrapatos *Amblyomma* sp no Parque Municipal dos Esportes “Chico Mendes”, no município de Sorocaba/SP. In: I Simpósio Estadual de Doenças Transmitidas por Carrapatos; 24-26 Jun 2009; Campinas, BR. São Paulo: Núcleo de Comunicação da Coordenadoria de Controle de Doenças - CCD; 2009; Suplemento Bepa 6(8):27.
21. Nasser JT, Lana RC, Feltrin LH, Dias CM. A situação dos parques públicos de Valinhos/SP após a retirada de capivaras. In: II Simpósio Estadual de Doenças Transmitidas por Carrapatos; 21-23 Set 2011; Campinas, BR. São Paulo: Centro de Produção e Divulgação Científica – CCD/SES-SP; 2011; Resumos p. 16.

22. Souza SSL, Alves MJC, Mayo RC, Oliveira VLM, VonZuben A. Monitoramento de carrapatos (Acari: Ixodidae) em área de manejo ambiental, parque Lago do Café, Campinas, SP. In: III Simpósio Estadual de Doenças Transmitidas por Carrapatos; Set 2013; Campinas, BR. São Paulo: Centro de Produção e Divulgação Científica – CCD/SES-SP; 2013; Bepa Especial 10(117):12.
23. Nunes FBP, Teixeira RHF, Martins TF, Barbieri ARM, Labruna MB. Manejo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) na primeira área endêmica da Febre Maculosa Brasileira autorizada pelo IBAMA como referência para outras áreas. In: II Simpósio Estadual de Doenças Transmitidas por Carrapatos; 21-23 Set 2011; Campinas, BR. São Paulo: Centro de Produção e Divulgação Científica – CCD/SES-SP; 2011; Resumos p. 18.
24. Blanton LS, Walker DH, Bouyer DH. Rickettsiae and Ehrlichiae Within a City Park: Is the Urban Dweller at Risk? *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2014; 14(2):168-70.

Correspondência/Correspondence to:

José Brites-Neto
Rua Fernando de Camargo, nº 876 – Centro
CEP: 13465-020 – Americana/SP, Brasil
Tel.: 55 19 34052260
E-mail: samevet@yahoo.com.br