

ISSN 1806-423-X
ISSN 1806-4272 – online

Boletim Epidemiológico Paulista

BEPA₄₇

PUBLICAÇÃO MENSAL SOBRE AGRAVOS À SAÚDE PÚBLICA
Volume 4 Número 47 novembro/2007

BEPA

Boletim Epidemiológico Paulista

PUBLICAÇÃO MENSAL SOBRE AGRAVOS À SAÚDE PÚBLICA

ISSN 1806-423-X

Volume 4 Número 47

novembro de 2007

Nesta Edição

- Investigação e controle de surto comunitário de doença meningocócica no Município de Campinas (SP), julho e agosto de 2007..... 4**
Local meningitis outbreak investigation and control measures in Campinas (SP), on July and August 2007
- Padronização e aplicação da técnica de isolamento do vírus da raiva em células de neuroblastoma de camundongo (N2A). 12**
Patterning and appliance of virus isolation techniques in mice neuroblastoma cells (N2A)
- Técnicas alternativas para coleta de carrapatos de vida livre e parasitária . . . 19**
Alternative techniques for ticks collection in the wildlife and parasitary
- Hantavirose: um risco invisível à saúde dos trabalhadores da cultura da cana de açúcar 24**
Hantaviriosis: an invisible risk to health of sugar care woers
- Instruções aos Autores 26**
Author's Instructions



Expediente

O Boletim Epidemiológico Paulista é uma publicação mensal da Coordenação de Controle de Doenças (CCD) da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.
Av. Dr. Arnaldo, 351 – 1º andar, sala 135
CEP: 01246-000 – São Paulo – Brasil
Tel.: (11) 3066-8823 e 3066-8825
bepa@saude.sp.gov.br

Coordenadora

Clélia Maria Sarmento de Souza Aranda

Editora Geral

Clélia Maria Sarmento de Souza Aranda

Editores Associados

Afonso Viviane Junior – Suceu/SP
Ana Freitas Ribeiro – CVE/CCD/SES-SP
Fernando Fiuza – Instituto Clemente Ferreira/CCD/SES-SP
José Carlos do Carmo – Cerest/CCD/SES-SP
Marcos da Cunha Lopes Virmond – ILSL/CCD/SES-SP
Maria Clara Gianna – CRT/DST/Aids/CCD/SES-SP
Maria Cristina Megid – CVS/CCD/SES-SP
Marta Lopes Salomão – IAL/CCD/SES-SP
Neide Yume Takaoka – Instituto Pasteur/CCD/SES-SP

Consultores Científicos

Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza – FM/Unesp/Botucatu/SP
Cristiano Corrêa de Azevedo Marques – CCD/SES-SP
Eliseu Alves Waldman – FSP/USP/SP
José Cássio de Moraes – FCM-SC/SP
Luiz Eduardo Batista – CCD/SES-SP
Luiz Jacintho da Silva – FM/Unicamp
Maria Bernadete de Paula Eduardo – CCD/SES-SP
Vilma Pinheiro Gawyszewsk – CCD/SES-SP

Coordenação Editorial

Cecília Abdalla
Cláudia Malinverni
Letícia Maria de Campos
Sylia Rehder

Núcleo de Comunicação – CCD

Endereço eletrônico: <http://www.ccd.saude.sp.gov.br>

Os artigos publicados são da responsabilidade dos autores. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial. Para republicação de qualquer material, solicitar autorização dos editores.

Projeto gráfico/editoração eletrônica

Marcos Rosado – Nive/CVE
Zilda M Souza – Nive/CVE

Artigo Original

Investigação e controle de surto comunitário de doença meningocócica no Município de Campinas (SP), julho e agosto de 2007

Local meningitis outbreak investigation and control measures in Campinas (SP), on July and August 2007

Brigina Kemp¹, Maria do Carmo Ferreira¹, Cristiane Gonzales Rossi², Naoko Yanagizawa J. da Silveira¹

¹Coordenadoria de Vigilância em Saúde (Covisa) da Secretaria Municipal de Saúde de Campinas (SMS)

²Vigilância em Saúde (VISA) Distrito de Saúde Norte SMS Campinas

Resumo

A doença meningocócica (DM) representa um importante problema de saúde pública devido a suas características de gravidade e o seu potencial de disseminação na população. Entre os dias 10 de julho e 7 de agosto de 2007 foi detectado um surto de DM nos bairros Vila Esperança e Jardim São Marcos, localizados na região Norte do município de Campinas, com a ocorrência de oito casos da doença e um caso secundário. O objetivo deste artigo é descrever o surto de DM ocorrido nesta localidade e as medidas de controle adotadas, bem como a operacionalização da atividade de vacinação. A taxa de ataque da doença foi de 122,9/100.000 habitantes e a faixa etária de ocorrência dos casos de 2 a 30 anos. O sorogrupo identificado foi o meningococo C com forma clínica predominante de meningite com meningococcemia. Não ocorreram óbitos. Foram adotadas como medidas de controle a quimioprofilaxia dos contatos intradomiciliares e a vacinação casa a casa, em área definida por meio de mapeamento georreferenciado. Utilizou-se a vacina conjugada contra o meningococo C para crianças de 2 meses a 1 ano, 11 meses e 29 dias e a polissacarídica para pessoas entre 2 a 34 anos. As ações de controle mostraram-se eficazes, uma vez que não foram registrados mais casos.

Palavras-chaves: doença meningocócica; surto; medidas de controle; vigilância epidemiológica.

Abstract

Meningococcal disease is an important public health problem due to its severity and potentiality to cause epidemic. Local outbreak occurred in neighborhoods Vila Esperança and Jardim São Marcos, located in the North region of Campinas. From 10 July to 7 August 2007, 8 cases and a secondary case were reported to Campinas Health Surveillance Service. The objective of this article is to describe the outbreak occurred in a small cluster, and control measures adopted as well as vaccination strategy. The attack rate was 122,9 per 100.000 inhabitants and affected the age groups 2 to 30 years old. Serogroup identified was *N.meningitidis* C and predominant clinical form was meningococcal septicaemia. Deaths had not occurred. Chemoprophylaxis of household contacts and immunization of high risk groups in each house was adopted as control measures in defined area using geographic information system. It was used polysaccharide vaccine to immunize the age groups affected and meningococcal conjugate vaccine was applied in children under 2 years. Cases were not reported after control measures because the strategy revealed to be efficient.

Key words: meningococcal disease; outbreak; control measures; epidemiological surveillance.

Introdução

A doença meningocócica (DM) representa um importante problema de saúde pública devido a suas características de gravidade e o seu potencial de disseminação na população. Inúmeras epidemias provocadas por esta doença já foram descritas em vários países, inclusive no Brasil, sendo a principal delas a que ocorreu na década de 1970, atingindo principalmente o município de São Paulo^{1,2}.

Nos dois últimos anos houve registro no Brasil de surtos de DM do sorogrupo C, atingindo os municípios de Muriaé (MG) em 2006³ e em 2007 de Sete Lagoas (MG)⁴. No Estado de São Paulo há relato da ocorrência de surto em Itapeva em 2004⁵ e Estrela D'Oeste em 2006⁶, ambos pelo meningococo sorogrupo C. Em todas estas situações foi indicada a vacinação da população do município, na faixa etária de maior risco, como uma das medidas de controle.

Surtos de DM em comunidades menores, restritos a escolas ou em bairros de uma cidade, também podem ocorrer e estão mais comumente associados ao sorogrupo C. Nos Estados Unidos, a partir da década de 1990, observou-se um aumento de surtos da DM pelo sorogrupo C em organizações institucionais ou na comunidade. A vacinação tem sido medida indicada nestas situações^{7,8}.

Recentemente, foram descritos dois surtos em localidades bem definidas no município de São Paulo. Em 2006 um surto ocorreu na comunidade

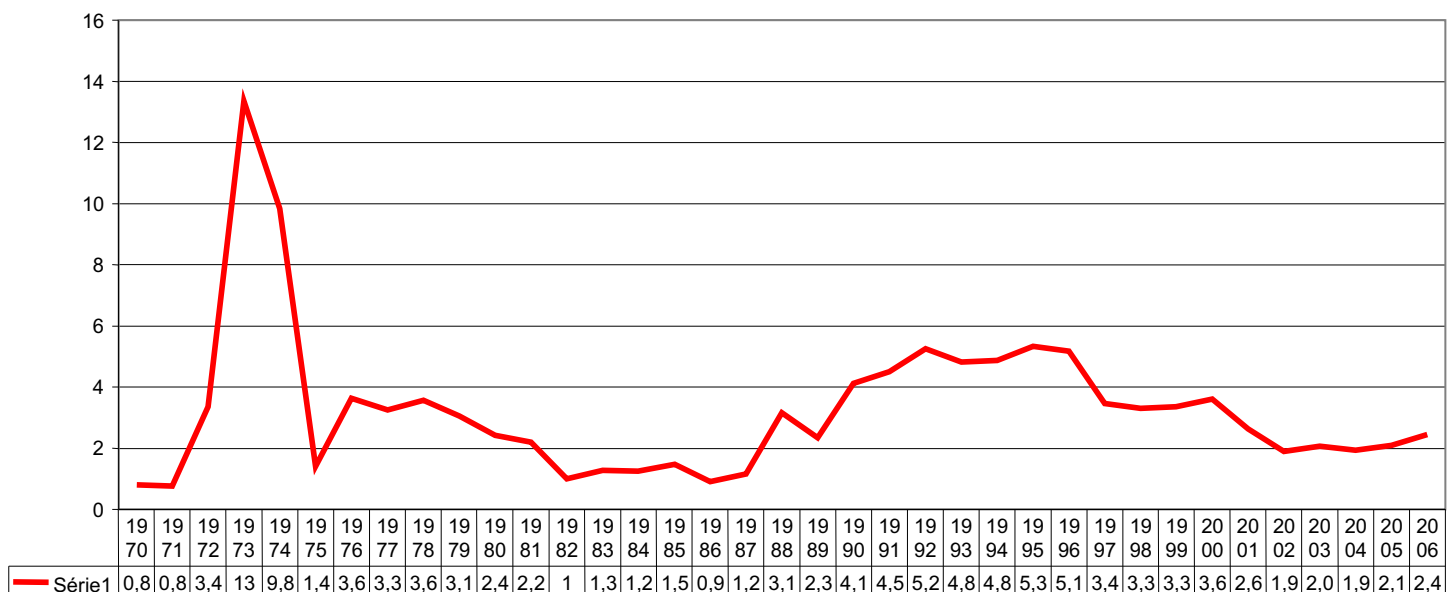
de Sucupira, com três casos e dois óbitos⁹; em 2007 houve um surto com três casos na comunidade Heliópolis, até o momento da publicação dois casos tinham evoluído para cura e 1 caso encontrava-se internado¹⁰. Nestes dois surtos também foi utilizada a vacinação contra o meningococo C para seu controle.

A DM é endêmica em Campinas (Gráfico 1). A vigilância epidemiológica do município tem registro de três epidemias na cidade. A primeira na década de 1970, durante a epidemia que assolou o Brasil; observou-se também um aumento de casos pelo sorogrupo B no final da década de 1980¹¹, e a última em meados da década de 1990 (1995/96) pelo sorogrupo C¹².

Após uma campanha de vacinação contra o meningococo C, em 1996, o sorogrupo B passou a predominar no município até o início dos anos 2000. A partir de então há uma nova tendência de crescimento do sorogrupo C, com alternâncias de predomínio entre os dois sorogrupos, representando cada um coeficientes de incidência em torno de 1 por 100.000 habitantes. O coeficiente de incidência médio da DM nos últimos seis anos é de 2,15 casos por 100.000 habitantes.

Em 2006 houve predomínio do sorogrupo B, sendo 42,3% do total de casos (11/26), enquanto o sorogrupo C contribuiu com 27% (7/26). Chamou atenção neste ano a ocorrência de quatro casos pelo W135 (15,4%), sendo que nos anos anteriores havia registro de 1 caso por este sorogrupo. A taxa de

Coeficiente de Incidência



Fonte: Sinan/Covisa/SMS-Campinas.

Gráfico 1. Coeficiente de incidência (100.000 habitantes) da doença meningocócica, Campinas (SP).

letalidade foi de 11,54%. Em todas as idades ocorreram casos, no entanto, os maiores coeficientes de incidência foram nos menores de 1 ano (19,86/100.000 habitantes).

Em julho de 2007 a vigilância epidemiológica do município de Campinas recebeu notificação de seis casos suspeitos de doença meningocócica de pacientes residentes em uma mesma localidade, nos bairros Vila Esperança e Jardim São Marcos, localizados no Distrito de Saúde Norte. Não se observava aumento de casos no restante do município ao comparar o mesmo período do ano anterior. Excluindo os seis casos ocorridos nesta localidade, o município contava com 13 notificações. No mesmo período do ano anterior (janeiro a julho) ocorreram 15 casos: 8 do sorogrupo B, 2 pelo C, 1 caso sem sorogrupo e 4 casos pelo W135, (Tabela 1).

Tabela 1. Casos de doença meningocócica, segundo sorogrupo, Campinas (SP), janeiro a julho, 2006 e 2007.

Ano	Sorogrupo B	Sorogrupo C	Sorogrupo W135	Sem Sorogrupo	Total
2006	8 (53,3%)	2 (13,3%)	4 (26,6%)	1 (6,6%)	15
2007*	1 (7,6%)	6 (46%)	3 (23%)	2 (15,3%)	13

Obs.: excluindo os casos ocorridos no Jardim São Marcos e Vila Esperança.

* 2007 1 caso pelo Y.

Fonte: Sinan/Covisa/SMS-Campinas.

Banco rápido de notificação.

O objetivo deste artigo é descrever o surto de DM ocorrido nos bairros Vila Esperança e Jardim São Marcos, no município de Campinas (SP), nos meses de julho e agosto de 2007, bem como as medidas de controle adotadas, destacando a operacionalização da atividade de vacinação.

Metodologia

Foi considerado como caso suspeito de DM todo paciente com sinais e/ou sintomas de meningite aguda, ou seja, febre alta, vômitos, cefaléia intensa, rigidez de nuca ou abaulamento de fontanela; com ou sem toxemia (sonolência e/ou torpor e/ou irritação) e lesões cutâneas (petéquias ou púrpuras)¹³.

Considerou-se como confirmado o caso suspeito com critério de confirmação laboratorial, necropsia, clínica ou vínculo epidemiológico, de acordo com os critérios de confirmação e classificação da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo¹⁴.

Os casos considerados neste estudo ocorreram entre os dias 10 de julho e 7 de agosto de 2007, em residentes dos bairros Jardim São Marcos e Vila Esperança, em Campinas (SP).

A definição de surto de DM utilizada foi: ocorrência de três ou mais casos confirmados ou prováveis do mesmo sorogrupo, excetuando-se os casos co-

primários e secundários, em um período menor ou igual a três meses, que residiam na mesma área geográfica e com uma taxa de ataque igual ou maior a 10 casos em 100.000 habitantes¹⁵.

Os casos foram identificados por meio de notificação rápida, já instituída no fluxo da vigilância das meningites no município de Campinas, posterior registro em banco de notificação rápida da DM da Coordenadoria de Vigilância em Saúde (Covisa) da Secretaria Municipal de Saúde de Campinas e no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), utilizando a ficha de investigação epidemiológica de meningite.

Os exames laboratoriais para o diagnóstico dos casos foram realizados inicialmente pelos hospitais de atendimento. A confirmação do sorogrupo foi feita pelo Instituto Adolfo Lutz Regional Campinas e Central, em São Paulo, por meio de cultura e/ou contraímunoelctroforese (CIE) e/ou látex e/ou exame de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).

A investigação dos casos foi realizada por meio da ficha epidemiológica e visita domiciliar (para investigação e realização da quimioprofilaxia). Novas visitas foram realizadas quando da ocorrência do sexto caso, para avaliar se havia relação entre eles, se a quimioprofilaxia havia sido realizada corretamente e se os comunicantes haviam tomado a medicação.

Os casos foram georreferenciados utilizando-se o software MapInfo® 6.0. Considerou-se como população exposta da área aquela referida pelos agentes comunitários de saúde que trabalham na localidade, com 6.509 habitantes.

Resultados

Descrição epidemiológica dos casos

No período compreendido entre os dias 10 de julho e 7 de agosto de 2007 ocorreram oito casos de DM, e mais um caso secundário, totalizando nove, em Vila Esperança e Jardim São Marcos, localizados na região Norte do município de Campinas. São bairros ocupados por população de baixa renda, vivendo em moradias pouco ventiladas e iluminadas, em situação de aglomeração domiciliar. Compreendem parte da área de abrangência de dois centros de saúde: Centro de Saúde Jardim São Marcos e Centro de Saúde Jardim Santa Mônica. São unidades que possuem Programa da Saúde da Família (PSF), contando com agentes comunitários de saúde.

Considerando-se os casos primários, a taxa de ataque foi de 122,9/100.000 habitantes. Nenhum dos casos notificados evoluiu para óbito. A distribuição temporal, segundo data de início de sintomas, pode ser vista no Gráfico 2.

Durante as visitas domiciliares realizadas por técnicos da Vigilância em Saúde (VISA) do Distrito Norte, Covisa e dos centros de saúde não foi identificado contato ou qualquer vínculo entre os casos, embora os bairros acometidos e as residências apresentassem localização geográfica próxima. A distribuição espacial dos casos aparece na Figura 1, demonstrando a agregação na área destacada.

Dentre os oito casos índices, 7 foram identificados como meningococo do sorogrupo C e 1 confirmado por critério clínico. A distribuição segundo critério de classificação encontra-se na Tabela 2.

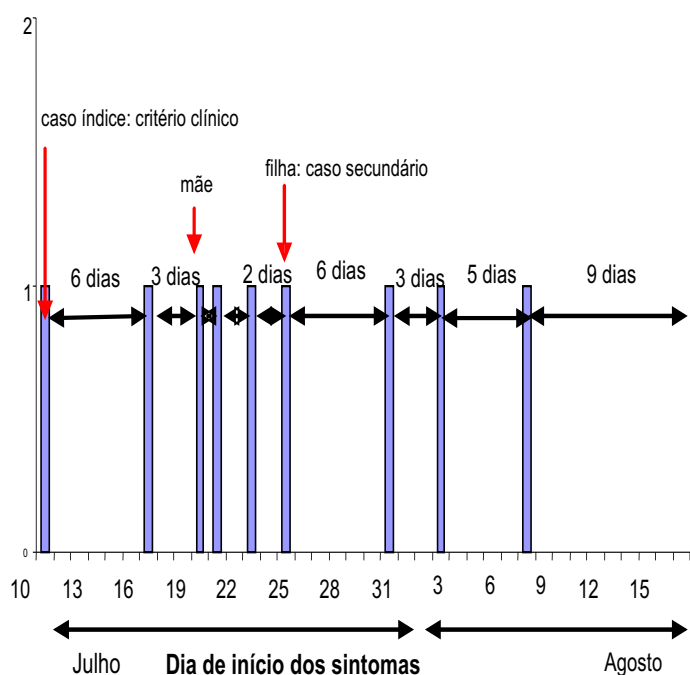


Gráfico 2. Casos de doença meningocócica, segundo data de início dos sintomas, nos bairros Vila Esperança e Jardim São Marcos, Campinas, julho/agosto de 2007.



Figura 1. Casos de doença meningocócica, segundo distribuição geográfica, nos bairros Vila Esperança e Jardim São Marcos, Campinas/SP, julho/agosto de 2007.

Tabela 2. Casos de doença meningocócica, segundo critério de classificação, nos bairros Vila Esperança e Jardim São Marcos, Campinas, julho/agosto de 2007.

Critério de classificação	Nº
Clínica	1
Cultura	6
PCR	1
TOTAL	8

O caso secundário foi identificado através de CIE como meningococo sorogrupo C. A forma clínica predominante foi meningite com meningococcemia (cinco casos). A faixa etária de ocorrência dos casos foi de 2 a 30 anos, e pode ser observada na Tabela 3, assim como as manifestações e formas clínicas estão resumidamente descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Manifestações e formas clínicas dos casos de doença meningocócica nos bairros Vila Esperança e Jardim São Marcos, Campinas, julho/agosto 2007.

Caso	Idade (anos)	Data início sintomas	Manifestações clínicas	Forma clínica
1	24	10/7/2007	Febre, vômitos, petéquias em MMII, artrite	MC
2	2	16/7/2007	Febre, vômitos, petéquias, rigidez de nuca, convulsões, Kernig/Brudzinski	MM + MC
3	30	19/7/2007	Dor abdominal intensa, mialgia, febre, cefaléia, vômitos, petéquias, rigidez de nuca, parada cardiorrespiratória	MC
4	22	20/7/2007	Febre, cefaléia, petéquias, rigidez de nuca, convulsões, Kernig/Brudzinski	MM + MC
5	13	22/7/2007	Febre, cefaléia, vômitos, sufusões hemorrágicas, rigidez nuca, convulsões, coma, agitação, distúrbio de comportamento	MM + MC
6	6	30/7/2007	Febre, vômitos, coma, convulsões, dor abdominal	MM
7	17	30/7/2007	Febre, cefaléia, vômitos, petéquias, rigidez de nuca, convulsões, Kernig/Brudzinski, icterícia	MM + MC
8	10	7/8/2007	Febre, cefaléia, vômitos, petéquias, rigidez de nuca, prostração	MM + MC

MM: meningite meningocócica.
MC: meningococcemia.

Estratégias de controle

Como estratégia de controle imediata, a cada caso notificado foi realizada a quimioprofilaxia em 45 contatos intradomiciliares dos oito casos confirmados. Porém, nas visitas domiciliares identificou-se que em dois casos não foi realizada de forma adequada e oportuna, levando ao surgimento de um caso secundário.

Outra estratégia utilizada foi a vacinação da população considerada exposta ao risco, após decisões conjuntas entre a Secretaria Municipal de Saúde de Campinas, a Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo por meio do Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac" (CVE) e do Grupo de Vigilância Epidemiológica (GVE 17 Campinas), órgãos da Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD) e a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS).

A vacinação foi realizada no dia 4 de agosto de 2007 (sábado), na população de 2 meses a 34 anos de idade, faixa etária de ocorrência dos casos. As vacinas utilizadas foram a conjugada contra o meningococo C para crianças de 2 meses a 1 ano, 11 meses e 29 dias e a polissacarídica, de 2 a 34 anos. Para crianças entre 2 meses e 1 ano de idade foi agendada a segunda dose da vacina. Foram convidados profissionais de enfermagem de toda a rede de saúde pública do município e no dia anterior ao da vacinação foi realizado o treinamento de todos que participariam da ação.

Não foi realizada a divulgação prévia da ação, de modo a evitar invasão de moradores de outras áreas.

Após o georreferenciamento dos casos, foi delimitada a área para a vacinação em torno dos casos, considerando os setores censitários (Figura 2).

A vacinação foi realizada casa a casa, com 191 pessoas, 17 delas atuando na supervisão e apoio e 162 nas equipes de vacinação, e 12 viaturas. Para as pessoas que não estavam em casa no momento, foi deixado um impresso nominal para comparecimento à unidade de saúde na semana seguinte. Posteriormente, foram realizadas busca ativa de moradores não-vacinados e vacinação nas escolas existentes na área do surto.

O registro das doses aplicadas foi feito em planilha constando nome, idade, endereço e vacina recebida. As doses de vacina aplicadas por faixa etária e a cobertura vacinal total pode ser observada na Tabela 4.

TABELA 4. Doses de vacina contra o meningococo C aplicadas para controle do surto de doença meningocócica nos bairros Vila Esperança e Jardim São Marcos. Campinas, julho/agosto 2007.

Faixas etárias							Total Pop.	Cobertura vacinal (%)
< 1 ano	1 a 2 anos	2 a 4 anos	5 a 8 anos	9 a 12 anos	13 a 19 anos	20 a 34 anos		
156	125	521	762	893	1137	2011	5605 6509	86,1

O último caso foi notificado no dia 9 de agosto de 2007 e apresentou início de sintomas em 7 de agosto, três dias após ter recebido a vacina polissacarídica.

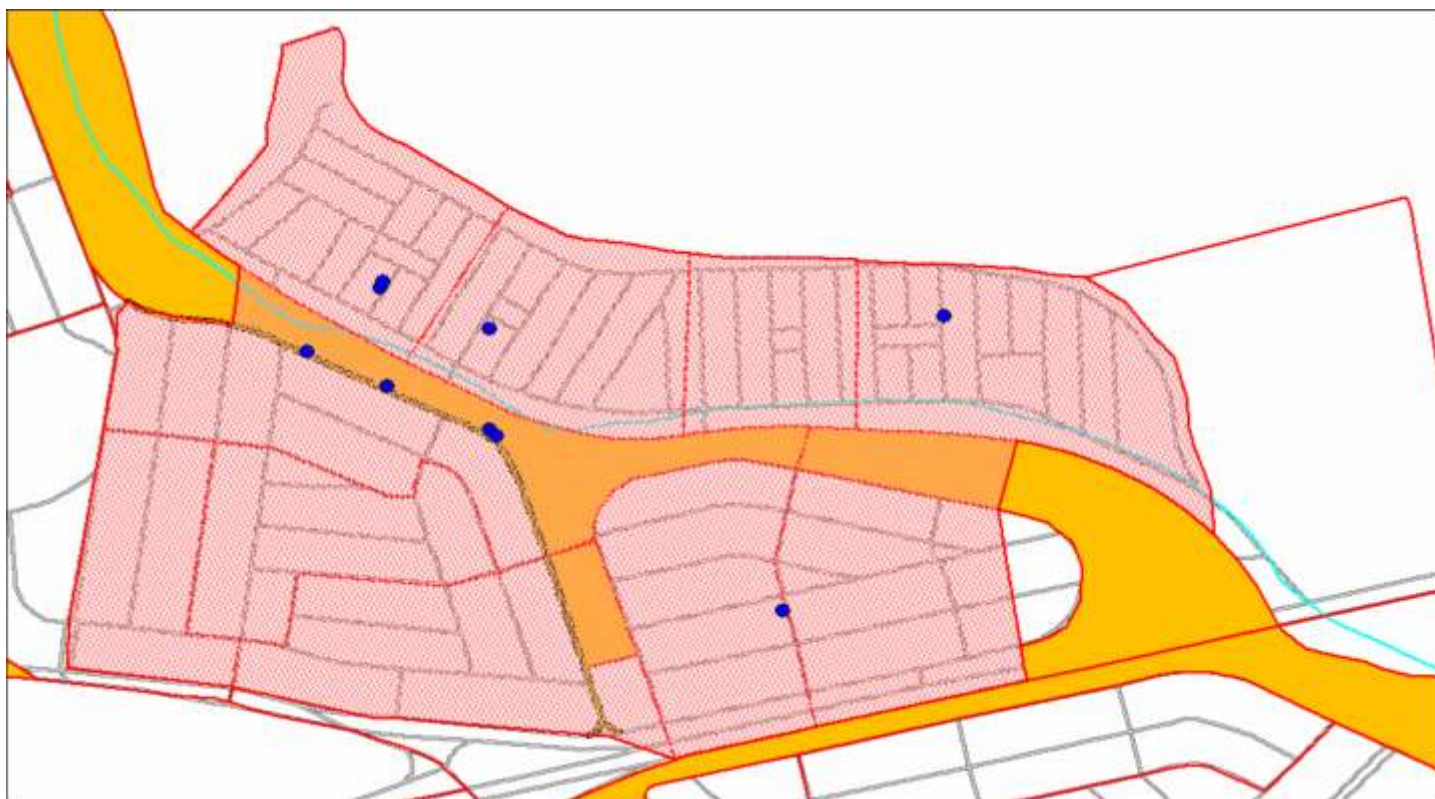


Figura 2. Área delimitada para vacinação casa a casa, na Vila Esperança e Jardim São Marcos. Campinas, agosto de 2007.

Discussão

Não se verificou nenhuma mudança no padrão epidemiológico da DM em Campinas, bem como nas meningites de outras etiologias no ano de 2007. O aumento de casos observado foi estritamente relacionado a uma área bem definida, nos bairros Vila Esperança e Jardim São Marcos. O padrão de ocorrência temporal e geográfica, a incidência alta na população exposta e a etiologia bem definida dos casos permitem concluir que houve um surto naquela localidade.

A incidência da DM depende de diversos fatores: suscetibilidade imunológica da população, cepas circulantes mais virulentas e baixas condições socioeconômicas¹⁶. Também pode estar relacionada à introdução de uma nova cepa na comunidade. No Canadá, Inglaterra, Espanha, Irlanda e Grécia, no início da década de 1990, foi observado surto da DM por introdução de nova cepa na comunidade, sendo necessária uma campanha de vacinação em massa¹⁰.

A região onde os casos ocorreram é caracterizada pela baixa condição socioeconômica das famílias, moradias de alvenaria pouco ventiladas e iluminadas e aglomeração domiciliar, condições estas que favorecem o adoecimento e a transmissão da DM.

Apesar da proximidade das residências dos casos, as famílias negaram qualquer contato, parentesco ou conhecimento sobre a ocorrência da doença nos bairros. Como os casos aconteceram em julho, mês de férias escolares, todas as crianças que adoeceram não frequentaram escola nos 15 dias que antecederam o início dos sintomas.

O caso secundário (filha) ocorreu dentro do mesmo domicílio, e pode ter sido devido à demora do diagnóstico do caso primário (mãe) que no início apresentou sintomas inespecíficos, não sendo feita inicialmente suspeita diagnóstica de DM.

O surto aconteceu nos meses de julho e agosto, obedecendo à sazonalidade da DM, com maior incidência durante o inverno e início da primavera¹⁶. A forma clínica que predominou foi meningite com meningococemia (5), só meningococemia (2) e só meningite (1), demonstrando a gravidade dos casos, embora nenhum deles tenha evoluído para óbito.

Um dos motivos para a DM ser de extrema relevância para a saúde pública é justamente sua gravidade, podendo ocasionar elevada letalidade e um percentual de seqüelas que varia entre 11%-25%, como surdez, retardo mental e amputações. A meningococemia é a expressão mais grave da doença, apresentando uma taxa de letalidade que varia entre 15%-30%. A forma clínica de meningite apresenta letalidade de aproximadamente 10%^{13,17,18}.

Dos oito casos ocorridos, seis foram atendidos no

Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp e dois no Hospital Municipal Dr. Mário Gatti. Um caso, uma menina de 6 anos, ficou com seqüela neurológica.

Do total de casos ocorridos, sete foram do meningococo do sorogrupo C e um não foi sorogrupo, demonstrando o bom trabalho das equipes dos hospitais onde os casos foram atendidos, de vigilância e do laboratório de referência. O caso no qual não foi possível a identificação do sorogrupo fez uso de antibióticos durante cinco dias antes da internação.

Apesar da DM ser mais incidente nos menores de 5 anos, a faixa etária acometida foi de 2 a 30 anos, mediana de 13 anos, sendo apenas um caso em menor de 5 anos. O intervalo de tempo entre um caso e outro foi curto, sendo que o tempo entre o início dos sintomas dos casos variou de 2 a 8 dias, com média igual a 3,6 dias.

Houve dificuldade em definir a área dos bairros onde seria realizada a vacinação, pois os bairros são contíguos e bastante populosos. Optou-se pela vacinação de toda a Vila Esperança e da parte do Jardim São Marcos mais próxima às residências dos casos.

Também houve dificuldade em calcular a população residente na área, pois os dados populacionais do Censo do IBGE realizado em 2000 não refletem a população atual e o cadastro do Programa da Saúde da Família, realizado em 2001, estava desatualizado, segundo os agentes comunitários de saúde e as coordenadoras dos centros de saúde onde os casos ocorreram. Optou-se por programar a vacinação com base no cadastro populacional das próprias unidades de saúde, não sendo possível a obtenção da população por idade. Devido à faixa etária acometida no surto, foi definida a vacinação para a população de 2 meses a 34 anos.

A vacinação durante um surto de DM tem como objetivo o seu controle e a prevenção de casos secundários. As vacinas polissacarídicas contra os sorogrupos A e C têm imunogenicidade de 85% em crianças maiores de 5 anos e em adultos, não sendo indicadas para menores de 2 anos. Entretanto, a imunidade alcançada é temporária, durando de 3 a 5 anos. Essas vacinas são utilizadas para o controle de surtos ou epidemias da doença em grupos definidos por espaços sociais ou geográficos¹⁷.

A vacina conjugada contra o meningococo C induz imunidade celular T-dependente, resultando em melhora da resposta imune em lactentes, com excelente memória imunológica e proteção de longa duração¹⁸.

A vacinação foi realizada nos domicílios da área programada em um único dia. Os moradores das

casas fechadas ou que não estavam na residência no dia da vacinação foram encaminhados para os Centros de Saúde São Marcos e Santa Mônica, referência para estes bairros, durante a semana subsequente à vacinação domiciliar.

A cobertura vacinal alcançada foi de 86,1%, porém, mostrou-se eficaz para o controle do surto, pois após a vacinação foi registrado somente um caso de DM, dentro do período esperado de incubação.

Avaliação da atividade de vacinação

No dia 6 de agosto, na segunda-feira após a vacinação casa a casa, foi realizada reunião para avaliação da vacinação de bloqueio com a presença de representantes do GVE 17 da Secretaria de Estado da Saúde, da Covisa, VISA Norte e dos Centros de Saúde Jardim São Marcos e Santa Mônica.

Observou-se que não houve problemas na conservação dos imunobiológicos e no seu preparo, bem como na sua aplicação, avaliando-se como sucesso a atividade, tendo em conta sua extensão (população alvo grande e área geográfica extensa). Com os dados de doses aplicadas no dia 4 de agosto, avaliou-se que não havia sido atingida cobertura vacinal de 95%. Ficou acordado que os centros de saúde realizariam a busca de moradores não-vacinados das áreas definidas, utilizando como base as planilhas de registro utilizadas no dia do bloqueio.

Em relação aos aspectos operacionais foram apontados como pontos positivos: a disponibilidade dos serviços de saúde e dos profissionais em atenderem rapidamente a atividade e a boa receptividade dos moradores dos bairros onde a ação foi desenvolvida e o sucesso do bloqueio com a execução da vacinação nas áreas previstas. Foram apontados como pontos negativos: deficiência de coordenação em campo das equipes de vacinadores; atraso em disponibilizar insumos e vacinas; atraso nos deslocamentos necessários; ausência de mapas com as equipes de vacinadores, dificultando sua localização e acompanhamento da cobertura dos domicílios, visto que grande parte dos

profissionais não atuava naquela região; e dificuldade no preenchimento da planilha.

Considerações finais

1. Houve um surto de DM localizado nos bairros Jardim São Marcos e Vila Esperança, no município de Campinas, nos meses de julho e início de agosto de 2007.
2. A boa evolução dos casos, sem a ocorrência de óbitos, apesar dos quadros clínicos graves, pode ser atribuída à qualidade do atendimento. Sugere-se que se faça identificação das cepas dos casos deste surto.
3. O sistema de vigilância epidemiológica do município permitiu a rápida identificação do surto e a implementação de estratégias para a interrupção da transmissão naquela comunidade.
4. A realização das ações conjuntas de quimioprofilaxia e de vacinação, a área delimitada e a faixa etária escolhida, bem como o alcance da cobertura vacinal, foram medidas acertadas, evidenciadas pelo controle do surto, uma vez que ocorreu apenas mais um caso na localidade após a vacinação, ainda dentro do período esperado (considerado pelo tempo de incubação da doença).

Colaboradores: Maria Cristina Restitutti no georeferenciamento dos casos.

Agradecimentos

Destaca-se o desempenho fundamental na investigação e nas ações de controle deste surto da equipes dos Núcleos de Epidemiologia Hospitalar do Hospital das Clínicas da Unicamp e do Hospital Municipal Dr. Mário Gatti; do Instituto Adolfo Lutz Regional Campinas e Central - São Paulo; das equipes do GVE 17 Campinas e do CVE. Em especial o trabalho das equipes dos Centros de Saúde São Marcos, Santa Mônica, do SAMU, do Almoxarifado, bem como de todos os outros profissionais da Secretaria Municipal de Saúde de Campinas que trabalharam na atividade de vacinação.

Referências bibliográficas

1. Moraes JC, Barata RB. Cem anos de endemias e epidemias. *Cad. Saúde Pública* 2005; 21(5):1458-1471.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Situação da prevenção e controle das doenças transmissíveis no Brasil. *In: Saúde Brasil 2004, uma Análise da Situação de Saúde*. Brasília, Ministério da Saúde 2004; p 299-337. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/capitulo6_sb.pdf (28 de outubro de 2007).
3. Brasil. Ministério da Saúde. Informe Técnico Surto de meningite no município de Muriaé (MG). Brasília, 2006. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_muriae_0806_final.pdf (28 de outubro de 2007).
4. Brasil. Ministério da Saúde. Informe Técnico Controlada a situação de meningite em Minas Gerais. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_meningite_mg_2805.pdf [2007, out28].
1. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Campanha de vacinação contra doença meningocócica do sorogrupo C DIR XXIII Sorocaba Município de Itapeva (SP). BEPA 2004, 11. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa11_meni.htm (22 de outubro de 2007).
6. Fernandes FC, Carvalhanas TRMP, Barbosa HA, Sato HK, Reina MCFP, Ferreira ER *et al.* Surto de doença meningocócica no município de Estrela D'Oeste (SP), setembro de 2006: da investigação ao controle. BEPA 2007, 37(4): 2-9. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/outros/bol_bepa3707.pdf (22 de outubro de 2007).
7. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Control and Prevention of Meningococcal Disease: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2005. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/rr/rr5407.pdf> (22 de outubro 2007).
8. Robinson P, Taylor K, Tallis G, Carnie J, Rouch G, Griffith J *et al.* An outbreak of serogroup C meningococcal disease associated with a secondary school. *CDI* 2001; 25(3):21-25.
9. Ciccone FH *et al.* Doença meningocócica: investigação de surto comunitário no Distrito Administrativo de Grajaú, Município de São Paulo, julho de 2006. BEPA 2006; 31(2):7-12. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa31_meni.htm (22 de outubro 2007).
10. Fernandes RMBP, Doro CM, Reis R, Silva APM, Souza DF, Barbosa HA *et al.* Doença meningocócica: investigação de surto comunitário no Distrito Administrativo do Ipiranga, município de São Paulo, julho de 2007. BEPA 2007; 44(4):10-17. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa44_meni.htm (22 de outubro de 2007).
11. Kemp B. Aspectos epidemiológicos e diagnóstico laboratorial da doença meningocócica no município de Campinas (SP), no período de 1988 a 1993. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP, 1994.
12. Campinas. Secretaria Municipal da Saúde. Boletim Epidemiológico. Ano VI - nº7. Novembro/1995.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 6ª edição. Brasília (DF), 2005.
14. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Cento de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Meningites. Manual de Instruções Critérios de Confirmação e Classificação 2003. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/resp/manu_cassmen.pdf (1 de agosto de 2007).
15. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Control and Prevention of Meningococcal Disease: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) 2005. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/prrview/mmwrhtml//r5407a1.htm> (25 de julho de 2007).
16. WHO. World Health Organization. Control of Epidemic Meningococcal Disease. Practical Guidelines, 2ª Ed. 1998. Disponível em: http://www.who.int/csr/resources/publications/meningitis/WHO EMC_BAC_98_3_EN/en/ (18 de agosto de 2007).
17. Barroso DE, Carvalho DN, Nogueira AS, Solari CA. Doença meningocócica: epidemiologia e controle de casos secundários. *Rev. Saúde Pública* 1998; 32(1):89-97.
18. Carvalhanas TRMP, Brandileone MCC, Zanella RC. Meningites bacterianas. BEPA 2005; 17:15-26. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa17_meni.htm (26 de outubro de 2007).

Correspondência/Correspondence to:

Brígida Kemp
R. Vasco Fernandes Coutinho, 109 – Jardim Nossa Senhora Auxiliadora
CEP: 13075-235 Campinas/SP Brasil
Tel.: (55) 19 2116-0187 – E-mail: brigina@terra.com.br

Artigo Original

Padronização e aplicação da técnica de isolamento do vírus da raiva em células de neuroblastoma de camundongo (N2A)

Patterning and appliance of virus isolation techniques in mice neuroblastoma cells (N2A)

Juliana Galera Castilho¹; Keila Iamamoto¹; Jonas Yoshitaka de Oliveira Lima¹; Karin Corrêa Scheffer¹; Pedro Carnieli Junior¹; Rafael de Novaes de Oliveira¹; Carla Isabel Macedo¹; Samira Maria Achkar¹; Maria Luiza Carrieri¹; Ivanete Kotait¹

¹Instituto Pasteur de São Paulo, Coordenadoria de Controle de Doenças/CCD/SES-SP

Resumo

O diagnóstico laboratorial da raiva é de suma importância para o controle e prevenção da doença, uma vez que os diagnósticos clínicos não são precisos. A imunofluorescência direta (IFD) é o teste mais utilizado e mesmo sendo altamente sensível, acurado e relativamente rápido, pode gerar resultados falsos negativos. Desta forma, recomenda-se o isolamento do vírus da raiva em camundongos (IVC) em amostras de Sistema Nervoso Central (SNC) de animais suspeitos de estarem infectados, teste que atualmente vem sendo substituído em vários laboratórios pelo isolamento viral em cultura de células (IVCC). O objetivo do presente estudo foi comparar a sensibilidade do teste de isolamento do vírus em cultura de células de neuroblastoma de camundongos (N2A), com o teste de IVC e com a IFD, bem como avaliar os resultados obtidos na rotina de diagnóstico do Instituto Pasteur, em relação à redução de custo, tempo e trabalho. Foram analisadas 105 amostras de SNC de diferentes espécies de animais pela IFD, pelo IVC e pelo IVCC: 50 de morcegos, 32 de cães, 13 de raposas e 10 de bovinos. Todas as amostras de morcegos e de bovinos apresentaram resultados concordantes para os três testes, enquanto que as de cães e raposas apresentaram concordância em somente 24 amostras (69%). Com base nestes resultados, a partir de 2004 estabeleceu-se que todas as amostras de morcegos enviadas ao Laboratório do Instituto Pasteur, após o diagnóstico por IFD, seriam submetidas ao IVCC, substituindo o uso de camundongos. No período de janeiro de 2004 a setembro de 2007, foram analisadas 11.298 amostras de morcegos. Um total de 67 amostras positivas por IFD e/ou IVCC foram também submetidas ao IVC e 61 amostras apresentaram resultados concordantes nos três testes, mostrando que o uso de células N2A é mais sensível para o isolamento de "vírus de rua" em uma rotina laboratorial para amostras de morcegos, sendo rápido e de menor custo do que o IVC.

Palavras-chave: raiva, cultura celular, neuroblastoma murino, morcegos

Abstract

Rabies laboratorial diagnosis is very important since clinical diagnosis is not precise. Fluorescent Antibody Test (FAT) is the most used test and even though it is highly sensible, accurate and fast, false negatives results may occur. Thus, the isolation of rabies virus in mice (VIM) of Central Nervous System (CNS) samples of suspected animals to be infected is also recommended and, nowadays, this test has been substituted in many laboratories by viral isolation in cell culture (VICC). The aim of the present study was to compare the sensibility of virus isolation in murine neuroblastoma (N2A) cell culture with VIM test and with FAT, as well as evaluate obtained results in the diagnostic routine from Pasteur Institute, regarding reduction of costs, time and work. A total of 105 CNS samples of different animal species were analyzed by FAT, VIM and

VICC: 50 bats, 32 dogs, 13 foxes and 10 bovines. All bats and bovines samples presented concordant results for the three tests, while dogs and foxes samples presented concordance only in 24 samples (69%). Based on these results, since 2004 it has been instituted that all bat samples sent to Pasteur Institute Laboratory, after diagnosed by FAT, should be submitted to viral isolation in cell culture, replacing the use of mice. In the period of January 2004 to September 2007, 11.298 bat samples were analyzed. A total of 67 positive samples for IFD and/or VICC were also submitted to VIM, and 61 samples presented concordant results for the three tests, and showed that the use of N2A cells is more sensible to "street virus" isolation of bat samples in laboratorial routine, being faster and lower in costs than VIM.

Key words: rabies, cell culture, murine neuroblastoma, bats

Introdução

A raiva é uma encefalite viral causada por um *Lyssavirus*, que continua sendo de grande importância na saúde pública, pelo elevado número de óbitos que ocasiona, especialmente nos países do continente Africano e Asiático, estimados em 55.000 óbitos/ano. O vírus da raiva apresenta intenso neurotropismo e após percorrer um caminho centrípeto, em direção ao sistema nervoso central (SNC), e sua intensa replicação nesse local, se distribui de maneira centrífuga para muitos órgãos do corpo, onde é capaz de se replicar eficientemente. Este fato explica porque o vírus da raiva pode ser cultivado em uma ampla variedade de linhagens celulares, sendo esse cultivo importante, não somente para estudos relativos à replicação viral e para a obtenção de antígenos destinados à produção de vacinas¹, mas também para utilização no diagnóstico laboratorial².

A função do laboratório de diagnóstico da raiva é de fundamental importância, pois seus resultados influenciam tanto na decisão de se instituir um tratamento profilático como, também, para adoção de medidas de controle em epizootias³.

A Organização Mundial da Saúde preconiza a imunofluorescência direta (IFD) como o teste de diagnóstico para a identificação do vírus da raiva, sendo este um teste altamente sensível, acurado e relativamente rápido, desenvolvido por Goldwasser e Kissling em 1958³. Entretanto, o isolamento do vírus por inoculação intracerebral em camundongos é também recomendado para a confirmação do diagnóstico pela IFD. Isto porque o isolamento do vírus por inoculação intracerebral em camundongos detecta vírus em amostras com baixa concentração viral, que pode gerar resultados falsos negativos na IFD⁴. A técnica de isolamento viral em camundongos (IVC), apesar de apresentar uma alta sensibilidade, pode demorar até 30 dias para obtenção do

resultado, e é possível somente quando há o contínuo fornecimento de animais, sendo, porém, de grande importância epidemiológica e acadêmica⁵. Por outro lado, o vírus da raiva pode ser cultivado em células, e em muitos laboratórios o IVC tem sido substituído pelo isolamento viral em cultura de células (IVCC), sendo este último um método relativamente fácil, barato e com redução de tempo para a obtenção dos resultados².

O uso de linhagens celulares para o cultivo do vírus da raiva foi primeiramente descrito em 1913, por Levaditi⁶. Entretanto, pensava-se que as amostras de "vírus de rua" adaptavam-se lentamente ao cultivo em células e desta forma, esse procedimento não foi adotado na rotina laboratorial de diagnóstico⁴. Na década de 70, as linhagens celulares BHK-21, CER e neuroblastoma de camundongo (N2A) foram identificadas como sistemas apropriados para o isolamento de "vírus de rua"^{7,8,9}. Atualmente, os estudos indicam que a célula N2A é a mais susceptível à infecção pelo vírus da raiva^{10,11,12,13}.

O objetivo desse trabalho foi comparar a sensibilidade dos testes de isolamento do vírus da raiva em cultura de células (N2A), com o isolamento em camundongos e com a IFD, como também analisar os resultados obtidos na substituição do IVC pelo IVCC, na rotina do Laboratório de Diagnóstico do Instituto Pasteur, em relação ao custo, tempo e trabalho.

Material e métodos

Amostras

Para a comparação entre as técnicas de diagnóstico foram analisadas 105 amostras de SNC de diferentes espécies animais já diagnosticadas por IFD e IVC: 50 de morcegos, 32 de cães, 13 de raposas e 10 de bovinos. As amostras de morcegos foram coleta-

das entre junho e dezembro de 2003, em vários municípios do Estado de São Paulo. As amostras de cães e raposas foram coletadas em 2005 e 2007 nos Estados do Pará, Maranhão e Pernambuco e as amostras de bovinos foram provenientes de vários municípios do Estado de São Paulo e Minas Gerais no ano de 2007.

Para avaliar a eficiência da técnica de IVCC, na rotina do Laboratório de Diagnóstico do Instituto Pasteur, foram diagnosticadas 11.278 amostras de morcegos. Essas amostras foram inicialmente diagnosticadas por IFD seguida pelo IVCC e coletadas, na sua maioria, em municípios do Estado de São Paulo, durante o período de 2004 a outubro de 2007, sendo: 2004 (2.219), 2005 (3.986), 2006 (3.466) e 2007 (1.607).

Imunofluorescência Direta (IFD)

Foram preparadas lâminas a partir do SNC de todas as amostras e submetidas à IFD, como descrito por Dean *et al.* (1996)¹⁴. A reação foi revelada com conjugado anti-rábico policlonal antinucleocapsídeo, produzido com soro hiperimune de coelho pelo Instituto Pasteur de São Paulo. As lâminas foram examinadas em microscópio de epiluminação de fluorescência, juntamente com controles positivo e negativo, assegurando o controle da qualidade do teste.

Isolamento Viral em Camundongos (IVC)

Uma suspensão a 20% (peso/volume) foi preparada a partir de SNC das 105 amostras de diferentes espécies animais e das 67 amostras de morcegos positivas pelo IVCC coletadas no período de 2004 a 2007. Cada uma das suspensões foi inoculada por via intracerebral em sete camundongos albinos suíços de 21 dias, com peso entre 11 e 14g, de acordo com a técnica preconizada por Koprowski (1996)¹⁵.

Isolamento Viral em Cultivo Celular (IVCC)

O isolamento *in vitro* do vírus em culturas celulares foi realizado em microplacas com 96 poços, seguindo o protocolo descrito por Webster e Casey (1996)², com adaptações realizadas no Instituto Pasteur. A suspensão foi a mesma utilizada para o isolamento viral em camundongos, que foi diluída em Meio Mínimo Essencial (MEM) (Sigma, cat. nº M0268), suplementado com 10% de soro fetal bovino e com células de neuroblastoma de camundongo, adquiridas da *American Type Culture Collection, Rockville, Md.* (ATTC), e diluídas em MEM (suplementada com 0,3mM de aminoácidos não essenciais e Gentamicina). As células foram

utilizadas em uma concentração de aproximadamente 5×10^5 células/mL, resultando em uma suspensão cerebral final de 4%. Cada suspensão foi inoculada em triplicata nas placas e foram utilizados controles positivos e negativos para garantir a qualidade interna. As placas contendo células foram incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂, por 96 horas. Após esse tempo, o meio foi removido e as células aderidas às placas foram fixadas com acetona a 80%, durante 15 min. Em seguida a reação foi revelada por IFD, como descrito por Dean *et al.* (1996)¹⁴, com pequenas modificações, e utilizando o conjugado anti-rábico policlonal antinucleocapsídeo, produzido com soro hiperimune de coelho, pelo Instituto Pasteur de São Paulo e, a seguir, foram incubadas a 37°C durante 1 hora. Logo após, as células foram lavadas três vezes em tampão fosfato salina (pH 7,4) e em água destilada. Finalizando o processo, as placas contendo células foram examinadas em microscópio invertido de fluorescência e os resultados foram assim determinados: a) resultado negativo nenhuma célula infectada detectada por fluorescência e, b) resultado positivo - presença de uma ou mais células infectadas detectadas por fluorescência.

Resultados

Os resultados das 105 amostras de SNC testadas IVCC, coletadas no período de 2003 a 2007, foram comparados com a IFD e o IVC, sendo os dados apresentados na Tabela 1. Em relação às amostras de morcegos e bovinos, os resultados de IFD e isolamento viral tanto em cultivo celular como em camundongos foram concordantes, mas em relação às amostras de cães e raposas os resultados se mostraram variáveis para as três técnicas realizadas (Tabela 2).

Tabela 1: Resultados dos testes realizados para o diagnóstico da raiva em 105 amostras de SNC de morcegos, bovinos, cães e raposas coletadas no período de 2003 a 2007.

Espécie Animal/ período	Nº de amostras	Diagnóstico	Testes diagnósticos para Raiva					
			IFD		Isolamento em Camundongos		Isolamento em Cultivo Celular	
			P*	N*	P	N	P	N
Morcegos (2003)	50	P	20	0	20	0	20	0
		N	0	30	0	30	0	30
Bovinos (2007)	10	P	10	0	10	0	10	0
		N	0	0	0	0	0	0
Cães (2005 e 2007)	32	P	25	0	12	0	14	0
		N	0	7	0	20	0	18
Raposas (2007)	13	P	13	0	4	0	7	0
		N	0	0	0	9	0	6
Total	105		68	37	46	59	51	54

P* = Positivo; N* = Negativo.

Tabela 2: Resultados dos testes realizados para o diagnóstico da raiva em 45 amostras de cães e raposas.

Nº de Amostras/Espécie	IFD	Isolamento em Camundongos	Isolamento em Cultivo Celular
13 cães e 6 raposas	+	+	+
5 cães	-	-	-
10 cães e 4 raposas	+	+	-
1 raposa	+	-	+
2 cães e 2 raposas	+	-	-
1 cão	-	+	+
1 cão	-	+	-

Fonte: Instituto Pasteur.

Em relação às 11.278 amostras de SNC de morcegos processadas na rotina do Laboratório do Instituto Pasteur, foi comparado o resultado da IFD e IVCC, além do IVC para as amostras positivas pela IFD e/ou pelo IVCC.

Verificou-se uma pequena discordância em relação aos resultados obtidos pelas técnicas utilizadas na rotina do Laboratório do Instituto Pasteur no período de 2005 e 2006. Nesse período, duas amostras, uma em cada ano, foram identificadas como positivas pelo IVCC, sendo negativas pela IFD. Em seguida, foram submetidas à técnica de IVC e em ambas isolou-se vírus, mas em uma das amostras apenas um camundongo adoeceu no 13º dia pós-inoculação e, após apresentar paralisia dos membros, foi eutanasiado no 17º dia. O encéfalo desse camundongo foi submetido à técnica de IFD, para confirmação da presença de antígeno viral, tendo apresentado resultado positivo para raiva.

Nesse mesmo período, duas amostras, sendo uma em cada ano, foram positivas na IFD e no IVCC, mas foram negativas no IVC. Este mesmo perfil de resultado foi também encontrado em duas amostras testadas no período de 2007.

Discussão

A exposição ao vírus da raiva pode resultar em uma infecção fatal em humanos, caso não haja, em tempo hábil, a adoção de medidas específicas de controle como a vacinação e a soro-vacinação pós-exposição. A decisão para o esquema de vacinação a ser utilizado é baseada nos resultados dos testes de detecção de antígeno viral realizada no tecido cerebral do animal agressor. A técnica de IFD tem demonstrado ser rápida e segura na rotina de diagnóstico da raiva¹⁶. O sucesso no diagnóstico da raiva com o uso da IFD tem induzido muitos laboratórios a abandonarem o uso do IVC para confirmação do resultado¹⁷. Entretanto, a experiência e testes de proficiência têm demonstrado que a IFD não é 100% confiável^{17,18}, fazendo com que os resultados desta técnica sejam confirmados pelo IVC, como é recomendado pela Organização Mundial da Saúde

(OMS)¹⁵. A importância do IVC é a capacidade em detectar o vírus da raiva em amostras com pequena concentração de vírus, situação esta que pode produzir resultados falsos negativos na IFD¹⁷. Entretanto, a desvantagem desta técnica é o longo tempo requerido para o término do diagnóstico, bem como o seu custo. Assim, a eficácia da combinação de técnicas de diagnóstico rápidas usando IFD e o IVCC tem sido explorada¹⁹.

O isolamento do vírus da raiva em cultura de célula é uma técnica que vem sendo bem desenvolvida e tem sido amplamente utilizada para o diagnóstico da raiva. Em muitos laboratórios esta técnica vem substituindo o IVC. O IVCC é relativamente fácil de realizar, com um custo aproximado cinco vezes menor que o IVC e, o mais importante, reduz consideravelmente o tempo necessário para a obtenção dos resultados, que podem ser obtidos em quatro dias, enquanto que o IVC pode necessitar até 30 dias para ser concluído².

Para uma técnica ser aceita como um teste de diagnóstico, sua sensibilidade deve ser comparada com testes já estabelecidos. Numerosas comparações têm sido realizadas entre a IFD, o isolamento viral em camundongos e o cultivo celular. Os resultados desses estudos indicaram que o IVCC é no mínimo tão sensível quanto o IVC, em relação à demonstração da replicação do vírus presente no tecido animal ou humano^{17,19,20}.

Estudos comparativos também indicam que a célula N2A apresenta uma sensibilidade superior em relação às outras linhagens celulares^{1,10,13}, permitindo que esta linhagem de células seja utilizada com segurança em uma rotina laboratorial para o isolamento de "vírus de rua"¹⁰.

No presente estudo, a linhagem celular N2A foi utilizada com sucesso. Das 105 amostras testadas, os resultados de 60 amostras (50 de morcegos e 10 de bovinos) foram concordantes em relação aos três testes realizados: IFD, IVC e IVCC (Tabela 1). Essas 60 amostras, enviadas ao laboratório para a continuidade do Programa de Vigilância da Raiva no Estado de São Paulo, foram diagnosticadas pelas três técnicas após seu recebimento.

O IVCC para as amostras de bovinos se mostrou bastante eficiente quando comparada com os outros testes de diagnósticos realizado (Tabela 1). Para cada uma destas amostras foram preparados inóculos de diferentes fragmentos do SNC: tronco encefálico, córtex, corno de Amon, cerebelo e um *pool* de todas essas estruturas. O vírus foi isolado através da técnica de cultivo celular em todas as estruturas, mas aquela que apresentou maior número de células infectadas foi o tronco encefálico, enquanto que o córtex apresentou menor número.

Isso nos leva a concluir que o tronco encefálico é o fragmento de eleição em amostras de bovinos para o teste de isolamento viral em cultivo celular. Em uma pesquisa desenvolvida utilizando amostras de eqüinos diagnosticadas por IFD e IVC, observou-se resultado semelhante: uma concentração maior de antígenos virais foi detectada no tronco encefálico e em tecidos de medula cervical²¹.

Em função da concordância dos resultados para os três testes de diagnóstico realizados em amostras de morcegos, além da grande quantidade de amostras dessa espécie que chega ao laboratório para a vigilância passiva, foi estabelecida como rotina laboratorial do Instituto Pasteur a associação das técnicas de IFD e o IVCC, substituindo, assim, o IVC.

Fatores relacionados às interferências ou mesmo à destruição do ecossistema natural dos morcegos, e o fato de estes animais serem extremamente versáteis à adaptação a novos ambientes (que hoje, oferecem condições especiais para sua sobrevivência, tais como alimentos e abrigos), fizeram com que eles adquirissem hábitos sinantrópicos, como um processo adaptativo, podendo ser encontrados com grande frequência em áreas urbanas²². Desta forma, muitos municípios têm realizado uma Vigilância Epidemiológica eficiente, o que faz com que o laboratório receba um grande número desses animais. Dentre as medidas de Vigilância Epidemiológica, há a recomendação de envio, ao laboratório de diagnósticos, de morcegos que são encontrados fora de seu hábitat natural e em condições atípicas, como os morcegos encontrados no chão e à luz do dia²³.

Em relação às 45 amostras de cães e raposas, apenas 24 apresentaram resultados concordantes para os três testes (sendo 19 positivos e 5 negativos) e 14 amostras positivas por IFD e IVC foram negativas no teste de IVCC. Isso pode ser atribuído ao fato de essas amostras terem sido diagnosticadas, primeiramente, em laboratórios da região Norte e Nordeste do país, sendo encaminhadas apenas fragmentos ao Instituto Pasteur (considerado Laboratório de Referência Nacional para Raiva) para estudos antigênicos e genéticos e, portanto, são amostras que foram submetidas a sucessivos congelamentos e descongelamentos. Sete amostras de cães e raposas apresentaram resultados não concordantes em relação aos três testes realizados (Tabela 2).

A principal razão para alteração da sensibilidade da IFD é o estado de conservação da amostra de tecido cerebral. Decomposição, ciclos repetidos de congelamento e descongelamento, exposição a agentes químicos podem reduzir a sensibilidade do teste²⁴.

Os resultados das amostras de canídeos para os três testes realizados mostraram variações em

relação à sensibilidade, não permitindo a substituição da técnica de isolamento do vírus em camundongos pelo cultivo celular para essas espécies na rotina laboratorial. Essa discordância é de difícil avaliação, em função de o Estado de São Paulo apresentar-se com a raiva canina sob controle, uma vez que os estudos antigênicos revelaram que a variante de vírus da raiva classicamente associada à raiva canina não tem sido detectada no Estado desde março de 1998^{25,26}. Este fato que não permite uma melhor análise da sensibilidade em relação ao isolamento viral em camundongos e em cultivo celular, em virtude do pequeno número de amostras positivas que vem sendo analisado.

A partir do ano de 2004 foi estabelecido, diante dos resultados apresentados, que todas as amostras de morcegos enviadas ao Laboratório do Instituto Pasteur seriam, depois de diagnosticadas por IFD, submetidas ao IVCC, substituindo o uso de camundongos, com grandes ganhos econômicos e éticos, diminuindo sensivelmente o uso de animais de laboratórios.

No período de janeiro de 2004 a outubro de 2007, 11.298 amostras foram diagnosticadas por IFD seguida do IVCC. As 67 amostras positivas por IFD e/ou IVCC foram também submetidas à técnica de IVC, e destas 61 amostras apresentaram resultados concordantes para os três testes realizados. Duas amostras que foram diagnosticadas negativas por IFD apresentaram resultados positivos por IVCC. Essas duas amostras foram submetidas ao IVC e apresentaram resultados positivos, resultado este confirmado pela técnica de IFD.

A IFD tem por finalidade identificar a presença de vírus em amostras suspeitas, assim, o resultado negativo da amostra em estudo pode ser atribuído à baixa concentração viral no fragmento analisado, pois se sabe que a distribuição do vírus no SNC não é homogênea²⁷. Uma hipótese para explicar a baixa concentração viral no SNC pode ser o fato de o animal em questão ter sido capturado no início da doença. No caso da tentativa do isolamento viral, de amostras provenientes de morcegos, é usado todo o SNC, o que pode explicar a positividade para ambas as técnicas de isolamento em relação à IFD.

Quatro amostras, entre seis que não apresentaram resultados concordantes, foram positivas na IFD e no IVCC, mas apresentaram resultados negativos no IVC. Esse resultado é concordante com um estudo realizado por Webster (1987)²⁰, o qual trabalhando com inóculos contendo pequena concentração viral demonstrou a presença de vírus em somente 50% quando utilizou camundongos, enquanto que no cultivo celular isolou vírus em 99% dos mesmos inóculos.

A inoculação em camundongos, via intracerebral, é um teste biológico sensível para a replicação do vírus da raiva e mesmo quando há baixa concentração de vírus na amostra o teste pode revelar positividade. Entretanto, em outras espécies, resultados discordantes entre a IFD e a inoculação em camundongos já foram observados, principalmente em eqüinos^{21,28}.

O isolamento do vírus fornece, não somente um diagnóstico da raiva, mas também se faz necessário para obtenção de antígenos necessários à caracterização do "vírus de rua", indispensável para estudos de Epidemiologia Molecular.

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que o uso de células de neuroblastoma de camundongos é sensível para o isolamento de "vírus de rua" em uma rotina laboratorial para amostras de morcegos. O isolamento do vírus através de cultivo celular oferece uma alternativa que tem se mostrado bastante sensível, rápida e economicamente vantajosa em relação ao isolamento viral em camundongos e esta de acordo com os padrões éticos atualmente exigidos para as atividades laboratoriais de pesquisa e de prestação de serviços.

Referências bibliográficas

1. King AA. Cell culture of rabies virus. *In*: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. **Laboratory techniques in rabies 1996**. Geneva: World Health Organization. p. 114-130.
2. Webster WA, Casey GA. Virus isolation in neuroblastoma cell culture. *In*: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. **Laboratory techniques in rabies 1996** Geneva: World Health Organization. p. 96-104
3. Goldwasser RA, Kissling RE. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies vaccine antigens. **Proc Soc Exp Biol Med**. 1958; 98: 219-223.
4. Meslin F-X, Kaplan MM. An overview of laboratory techniques in the diagnosis and prevention of rabies and in rabies research. *In*: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. **Laboratory techniques in rabies 1996**. Geneva: World Health Organization. p. 9-27.
5. Chhabra M, Mittal V, Jaiswal R, Malik S, Gupta M, Lal S. Development and evaluation of an *in vitro* isolation of street rabies virus in mouse neuroblastoma cells as compared to conventional tests used for diagnosis of rabies. **Ind J of Med Microbiol**. 2007; 25: 263-266.
6. Levaditi MC. Virus rabique et culture des cellules in vitro. **C R Soc Biol**. 1913; 75: 505.
7. Larghi OP, Nebel AE, Lazaro L, Savy VL. Sensitivity of BHK-21 cells supplemented with diethylamino ethyl-dextran for detection of street rabies virus in saliva simples. **J Clin Microbiol**. 1975; 1: 243-245.
8. Smith AL, Tignor GH, Emmons RW, Woodie JD. Isolation of field rabies virus strains in CER and murine neuroblastoma cell cultures. **Intervirolgy** 1978; 9: 359-361.
9. Smith AL, Tignor GH, Mifini K, Motohaski T. Isolation and assay of rabies sero group viruses in CER cells. **Intervirolgy** 1977; 8: 92-99.
10. Rudd RJ e Trimarchi CV. Tissue culture technique for routine isolation of street strain rabies virus. **J Clin Microbiol**. 1987; 25: 1456-1458.
11. Tsiang H. An in vitro study of rabies pathogenesis. **Bull Inst Pasteur** 1985; 83: 41-56.
12. Tsiang H, Koulakoff A, Bizzini B, Berwald-Nether Y. J. **Neuropathol Exp Neurol**. 1983; 42: 439-452.
13. Umoh JU, Blendon DC. Comparasion of primary skunk brain and kidney and raccoon kidney cells with established cell lines for isolation and propagation of street rabies virus. **Infect Immun**. 1983; 41: 1370-1372.
14. Dean DJ, Abelseth MK, Atanasiu P. Fluorescent antibody test. *In*: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. **Laboratory techniques in rabies 1996**. Geneva: World Health Organization. p. 88-95.
15. Koprowski, H. The mouse inoculation test. *In*: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. **Laboratory techniques in rabies 1996** Geneva; World Health Organization. p. 80-87.
16. Dean DJ, Abelseth MK. The fluorescent antibody test. *In*: Kaplan MM, Koprowski H. **Laboratory techniques in rabies 1973** Geneva, World Health Organization. p. 73-83
17. Rudd RJ, Trimarchi CV. Development and Evaluation of an in vitro virus isolation

- procedure as a replacement for the mouse inoculation test in rabies diagnosis. **J Clin Microbiol.** 1989; 27: 2522-28.
18. Chhabra M, Bhardwaj M, Ichhpujani RL, Lal S. Comparative evaluation of commonly used laboratory test for post mortem diagnosis of rabies. **Ind J Path Microbiol.** 2005; 48: 190-93.
 19. Chitra L, Pandit V, Kalyanaraman VR. Use of murine neuroblastoma culture in rapid diagnosis of rabies. **Ind J Med Res.** 1988; 87: 113-16.
 20. Webster WA. A tissue-culture infection test in routine rabies diagnosis. **Can J Vet Rec.** 1987; 87: 113-16.
 21. Carrieri ML, Peixoto ZM, Paciência ML, Kotait I, Germano PM. Laboratory diagnosis of equine rabies and its implications for human post exposure prophylaxis. **J Virol Methods** 2006; 138: 1-9.
 22. Kotait I *et al.* Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. **Boletim Epidemiológico Paulista** 2007; 4: 1-8.
 23. Kotait I. Programa de prevenção e controle da raiva transmitida por morcegos em áreas urbanas. **Boletim Epidemiológico Paulista** 2006; 3 (36): *on line*.
 24. Trimarchi CV, Nadin Davis SA. Diagnostic Evaluation. *In:* Jackson AC, Wunner WH. **Rabies.** San Diego, CA, USA. 2ed. p. 411-462.
 25. Carrieri *et al.* *Desmodus rotundus* como transmissor da raiva canina e felina no Estado de São Paulo. *In:* Seminário Internacional de Raiva, 2000 ago; São Paulo: Anais. p.42.
 26. Carrieri ML, De Matos CA, Carnieli JrP, De Matos C, Favoretto SR, Kotait I. Canine and feline rabies transmitted by variant 3-*Desmodus rotundus* in the State of São Paulo, Brazil. *In:* Seminário Internacional: Morcegos como transmissores da raiva. 2001 dez; São Paulo: Anais. p.51.
 27. Kotait I, Carrieri ML. Raiva. *In:* Trabulsi LR, Alterthum F. **Microbiologia.** São Paulo: Atheneu, 2004. p. 651-57.
 28. Peixoto ZMP, Cunha EMS, Sacramento D, Souza MCM, Queiroz da Silva LH, Germano PML, Kotait I. Rabies laboratory diagnosis: peculiar features of samples from equine origin. **Braz J Microbiol.** 2000; 31: 72-75.

Técnicas alternativas para coleta de carrapatos de vida livre e parasitária *Alternative techniques for ticks collection in the wildlife and parasitary*

Sandro Marques¹

Moacyr Giovanini Dalbon²

¹Subgerência de Laboratório de Identificação e Pesquisa de Fauna Sinantrópica do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) Covisa Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo (SMS-SP)

²Subgerência de Controle de Animais Sinantrópicos (CCZ/Covisa/SMS-SP)

Resumo

Amblyomma cajennense é um carrapato considerado de importância médico-veterinária, transmissor da Febre Maculosa Brasileira (FMB), bem como responsável por prejuízos econômicos na pecuária, infestando áreas de pastagens e animais, além do incômodo à população que convive nestas áreas. Técnicas de coleta para detecção de infestação no ambiente são aplicadas nas ações de Vigilância Acarológica em muitos municípios, sendo as mais conhecidas, a técnica do pano de arrasto e a técnica do gelo seco. Duas novas técnicas são apresentadas neste trabalho: técnica do bastão para coleta no ambiente e a técnica do pregador para coleta em animais. A primeira foi testada e aplicada durante ações de vigilância da Prefeitura no Município de São Paulo, e a segunda em animais apreendidos no Centro de Controle de Zoonoses. A técnica do bastão visa promover a segurança do operacional durante o manuseio, reduzindo a exposição humana na área infestada; enquanto a técnica do pregador permitiu a coleta do carrapato fixado, com maior facilidade e integridade do mesmo, garantindo assim a identificação.

Palavras-chave: *Amblyomma cajennense*, Febre Maculosa, técnicas de coleta, pano de arrasto, gelo seco, vigilância acarológica.

Abstract

Amblyomma cajennense is a tick considered important by medical and veterinary reasons, which transmits Brazilian Maculous Fever (FMB), and responsible, as well, by economical losses in cattle breeding, infesting grazing grounds and animals, as well as representing a nuisance for the population living in these areas. Collection techniques for infestation detection in the environment are applied in actions for the Surveillance of acarus in many cities, and the most widely known are the technique of the catching cloth and the dry ice technique. Two new techniques are presented in this study: the stick collection technique in the environment and the fastener technique for collection in animals. The first was tested and applied during surveillance actions of the municipal government of the city of São Paulo, and the second in animals apprehended in the Zoonosis Control Center. The stick collection technique is designed to promote the safety of the staff while handling the animals, reducing human exposition in the infested area; the fastener technique allowed easier collection of the fixed tick, preserving it whole, therefore allowing identification.

Key words: *Amblyomma cajennense*, Maculous fever, collection techniques, catching cloth technique, dry ice, surveillance of acarus.

Introdução

A febre maculosa é uma doença infecciosa aguda, causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii* e transmitida pelo carrapato da espécie *Amblyomma cajenense* (carrapato-estrela), espécie comumente encontrada em animais domésticos e silvestres, considerada uma praga nos campos e pastagens no período de inverno, quando estão em fase imatura (micuins)¹. Outra espécie do gênero *Amblyomma*, o *A. aureolatum*, já foi encontrada naturalmente infectada pela *R. rickettsii*, podendo ser transmissora experimentalmente²; *A. dubitatum* (= *A. cooperi*) pode estar relacionada com o ciclo enzoótico da riquetsia entre os hospedeiros primários (capivara)³.

Diante dos casos suspeitos e confirmados de febre maculosa ocorridos nos últimos anos na Grande São Paulo e na capital paulista, ações e intervenções ambientais foram executadas para diagnósticos das espécies e direcionamento das ações de controle pelas Supervisões de Vigilância em Saúde (Suvis) e Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) órgãos da Secretaria Municipal da Saúde de São Paulo (SMS-SP). Uma dessas ações, durante a vigilância acarológica, consiste na coleta de carrapatos no ambiente e nos hospedeiros (cão, gato, cavalo), para determinar a espécie vetora e estimar o nível de infestação no ambiente.

Atualmente, segundo a Superintendência de Controle de Endemias (Sucen)⁴, da Secretaria de Estado da Saúde, as técnicas para coleta de carrapatos no ambiente são o pano de arrasto e a técnica do gelo seco; a primeira apresenta maior eficiência na captura de formas imaturas (larvas e ninfas) e a segunda, na de adultos. O pano de arrasto pode ser aplicado em ambiente com vegetação rasteira, de preferência sem a interferência de arbustos e outros tipos de vegetação que caracterizam "pasto sujo"; a técnica do gelo seco para liberação do gás carbônico pode ser aplicada em locais com vegetação um pouco mais alta e diversificada.

Outras técnicas de coleta no ambiente aplicadas por Arzuá⁵ são as armadilhas de solo tipo *pitfall* e o método de coleta de folhço. A primeira consiste em potes ou baldes contendo álcool 70%, enterrados no chão e vistoriados após determinado período, a fim de verificar a queda dos carrapatos. O segundo método consiste na coleta de 1 m² de folhço do solo e de vegetação rasteira, em pontos específicos ou aleatórios da

área de estudo, levados para posterior triagem em laboratório.

A técnica para coleta no hospedeiro é preconizada através do método de torção do carrapato, com o auxílio de uma pinça, puxando-o até a soltura do aparelho bucal da pele do animal. Métodos utilizados popularmente para a retirada do carrapato são o aquecimento do carrapato com objetos pontiagudos e utilização de produtos químicos. Ambos são considerados perigosos, podendo intensificar a transmissão das riquetsias pelo carrapato no momento do parasitismo, durante a aplicação da técnica.

Material e métodos

O presente trabalho visa a notificar duas novas técnicas alternativas de coleta de carrapatos, desenvolvidas pela Coordenação de Controle de Sinantrópicos, sendo testadas juntamente com o Lab-Fauna, do CCZ, em vistorias no Município de São Paulo: técnica de arrasto com haste regulável (1 a 3 m) para uso no ambiente e a técnica do prendedor modificado, para uso no corpo do animal hospedeiro. A técnica com a haste consiste de uma ou mais flanelas brancas, semelhante à técnica do pano de arrasto, fixadas em uma das extremidades da haste (Foto 1), que permite pesquisa numa área mais abrangente, em faixas lineares (Foto 2) ou cobrindo áreas no raio das medidas da haste regulável (Foto 3), com o mínimo de deslocamento e de exposição das pessoas que estão investigando o ambiente infestado. A técnica facilita a coleta de exemplares fixados nos panos (Foto 4).



Foto1. Técnica do pano de arrasto modificado com o uso de haste prolongadora regulável.



Foto 2. Uso da técnica para coleta de exemplares de carrapato em faixas lineares, com reduzida exposição do profissional de campo.



Foto 3. Técnica de coleta de exemplares de carrapato em áreas circulares, evitando a exposição da equipe.



Foto 4. Coleta de exemplares de carrapato fixados nos panos.

A técnica do prendedor modificado consiste de um mecanismo semelhante a uma pinça, adaptado de um “prendedor de roupa” (Foto 5). Modificado por desgaste em sua extremidade, em forma de cunha, permite prender o carrapato (Foto 6), quando fixo no hospedeiro, pela base do aparelho bucal denominado hipostômio (Foto 9) e promover os movimentos giratórios mais facilmente (Foto 7), até a retirada do exemplar (Foto 8), sem danificar por rompimento, o aparelho bucal (Foto 9). Oferece maior segurança, uma vez que não ocorre o contato manual com o corpo do carrapato, diferentemente da técnica que utiliza a pinça tradicional. A ponta de encaixe do pregador exerce uma pressão firme, constante e segura no momento da torção do carrapato fixado, além de mantê-lo preso ao prendedor no momento da soltura do hospedeiro (Foto 8). Quando utilizada a pinça, por vezes, o exemplar escapa por falha de manipulação, dificultando seu encontro na vegetação ou mesmo ocasionando a perda nos casos de único exemplar.

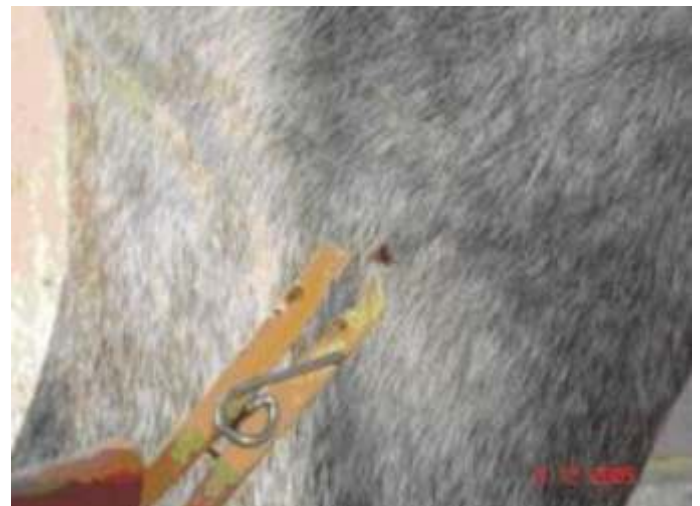


Foto 5. Localização do carrapato no corpo do cavalo hospedeiro.



Foto 6. Carrapato fixado pelo prendedor modificado.



Foto7. Movimentos de girar para promover o desprendimento do carrapato.



Foto 10. Vistoria de carrapatos no corpo do animal hospedeiro.

Fotos: Arquivo CCZ Carlos A. Madeira Marques Filho, Rogério Dalcol e Moacyr Giovanini Dalbon.



Foto 8. Retirada do ectoparasita preso ao prendedor.



Foto 9. Detalhe do prendedor modificado. Em destaque o aparelho bucal (hipostomio), à direita, sem ser danificado.

A técnica da haste regulável foi aplicada e testada, inicialmente, durante vistorias em Campo Limpo, por solicitação da SUVIS M' Boi Mirim-SMS, nas proximidades da represa Billings, Jd. Caiçara e no Parque Cemucam por solicitação do Departamento de Parques e Áreas Verdes da Secretaria do Verde e do Meio Ambiente (Depave/SVMA), localizado no município de Cotia (SP). As áreas de aplicação da técnica eram constituídas de vegetação característica de gramado e mato alto, sem a presença de troncos, gravetos e arbustos de pequeno e médio portes; outras localidades com tais características serão utilizadas para novos testes desta técnica, conforme a demanda solicitada à Coordenação de Controle de Animais Sinantrópicos do CCZ. A técnica do prendedor vem sendo testada em equinos e bovinos eventualmente infestados por carrapatos (Foto 10), quando apreendidos pela Coordenação de Grandes Animais do CCZ.

Conclusão

Ambas as técnicas mostraram-se importantes quanto à agilidade das amostragens em campo, sendo possível sua aplicação em vigilância acarológica, inclusive no que diz respeito à segurança do profissional durante a execução, seja em pesquisa de campo, seja no manejo e lida de animais em áreas infestadas, ou mesmo de animais com infestações eventuais. Isso porque, no caso da técnica da haste regulável, procurou-se reduzir a possibilidade de infestação corpórea do profissional de campo por carrapatos, quando do trabalho em ambientes reconhecidamente infestados. Quanto à técnica do prendedor, o intuito foi evitar o contato manual com

carrapatos ingurgitados e possivelmente infectados, inclusive quando rompidos ou danificados acidentalmente durante a coleta manual no corpo do animal hospedeiro pelo método de torção, e conseqüentemente reduzir o risco de infecção humana por microorganismos patogênicos. Além disso, evitar a possibilidade do rompimento do aparelho bucal que, ficando no hospedeiro, pode produzir os processos alérgicos mais duradouros.

Referências bibliográficas

1. Guimarães JH *et al.* Ectoparasitos de Importância Veterinária. São Paulo: Editora Plêiade/Fapesp 2001; 218p.
2. Pessôa SB, Martins AV. Parasitologia Médica. 11ª ed. Editora Guanabara Koogan.
3. CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Febre Maculosa: Informe Técnico 1. São Paulo, 2002. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/ZOO/IF_FMB2.pdf.
4. Sucen. Superintendência de Controle de

Agradecimentos:

A Carlos A. Madeira Marques Filho e Idalina Maria Pires, biólogos da Subgerência de Controle de Sinantrópicos (CCZ/COVISA/SMS-SP); Elisabeth Gonçalves Fernandes Bertoletti, Rogério Dalcol e Marco Otávio Mattos Jr., biólogos da Subgerência de Laboratório de Fauna Sinantrópica (CCZ/COVISA/SMS-SP); e Débora Ferrari, bióloga da SUVIS M'Boi Mirim: SMS-PMSP

Endemias. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Manual de Vigilância Acarológica. São Paulo, 2004; 62 p. Disponível em:

5. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.
6. Arzua M. Bioecologia do parasitismo de carrapatos (Acari: Ixodidae) em aves do bosque Reinhard Maack, Curitiba, Paraná e caracterização molecular, diagnóstico morfológico e descrição da larva de *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772). – Curitiba, 2002. – [Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas Universidade Federal do Paraná].

Correspondência/Correspondence to:

Sandro Marques
Centro de Controle de Zoonoses-COVISA SMS-PMSP
Rua Santa Eulália, 86 – Santana
CEP: 02021-020 – São Paulo-SP – Brasil
tel.: (55) 11 6224-5536 e 6221-0313
email: moacyr@prefeitura.sp.gov.br

Hantavirose: um risco invisível à saúde dos trabalhadores da cultura da cana de açúcar

Hantaviriosis: an invisible risk to health of sugar cane workers

Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos do Instituto Adolfo Lutz

Dentre os 110 casos de hantavirose que ocorreram no Estado de São Paulo no período de 1993 a 2007, 18 casos (16,36%) estão relacionados aos trabalhadores do cultivo da cana-de-açúcar. Inquérito realizado na população da zona rural da região de Ribeirão Preto (SP), onde são encontradas as maiores plantações de cana-de-açúcar do País, estima uma soroprevalência de 16%. Dos indivíduos soropositivos, a maioria referiu realizar alguma vez trabalhos inerentes ao cultivo da cana.

A hantavirose é uma zoonose transmitida por roedores silvestres pertencentes à subfamília sigmodontinae típica do continente americano. As infecções humanas causadas pelos hantavírus ocorrem, principalmente, pela inalação de aerossóis de partículas virais, formados a partir de excretas de roedores infectados. Outras formas mais raras de transmissão podem ocorrer através de escoriações cutâneas ou mordeduras de roedores, contato do vírus com tecido conjuntivo da boca, olhos e nariz.

No Novo Mundo a hantavirose manifesta-se sob a forma clínica de síndrome cardiopulmonar por hantavírus (SCPH), com a letalidade variando entre 40% e 56%. A transmissão de hantavírus entre os roedores ocorre por meio de aerossóis e mordidas ocasionadas pela competição por alimentos, procriação e espaço. A infecção por hantavírus em seu roedor reservatório resulta em infecção crônica, que permite a eliminação de vírus durante toda a sua existência, que dura em média 16 meses.

O perfil agrícola e as atividades agrícolas constituem os fatores determinantes na transmissão da SCPH no Brasil. As alterações na vegetação natural, onde o homem introduz plantas de interesse comercial, acaba fornecendo aos roedores existentes na natureza uma nova fonte de alimentação, propiciando o aumento rápido na densidade populacional destes animais nas áreas ocupadas pelo homem. Entre as principais culturas que atuam dessa forma destacamos o capim braquiária, cana-de-açúcar, milho, arroz e capim colômbio. As áreas cultivadas por capim braquiária (*Brachiaria decumbens*) e cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) são as que mais favorecem a manutenção de colônias de roedores silvestres na natureza.

E nos ambientes compostos por estes dois tipos de vegetação é que já foram observadas as maiores densidades populacionais de roedores silvestres. Contudo, vale ressaltar que a situação que mais contribui para a infecção humana é quando as excretas dos roedores infectados são eliminadas no interior de habitações humanas que se encontram a uma distância menor que 50 metros destes ambientes compostos, porque os vírus se mantêm mais ativos por estarem livres da exposição aos raios ultravioletas do sol e efeitos dispersivos de corrente de ar. De maneira semelhante às infecções humanas adquiridas em ambientes abertos, também ocorrem por meio de aerossóis ou de escoriações cutâneas durante as atividades de plantio, colheita, transporte e armazenamento de produtos agrícolas.

A colheita manual da cana-de-açúcar merece uma especial atenção na epidemiologia do hantavírus no Brasil. Casos de SCPH foram registrados nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso e Goiás, tendo os pacientes essa ocupação, o que a coloca como uma atividade profissional de grande risco. O roedor *Bolomys lasiurus*, reservatório do hantavírus Araraquara, tem como seu ecossistema o cerrado onde estão inseridas as maiores plantações e usinas canavieiras do País. Esta espécie de roedor prefere viver no interior do pasto de braquiária, alimentando-se das suas sementes e extraindo água de suas raízes, o que permite a manutenção de populações desta espécie de roedor em densidades altíssimas. Porém, no período de estiagem nas regiões de cerrado, que acontece entre abril e agosto, a massa vegetativa do capim braquiária diminui consideravelmente, obrigando as comunidades de roedores a viverem no interior dos canaviais, onde eles conseguem abrigo, alimento e água roendo os caules de cana-de-açúcar.

Estudos epidemiológicos mostram que as circunstâncias e os fatores determinantes para a ocorrência da doença estão intimamente relacionados ao comportamento do trabalhador durante a colheita manual e transporte da cana. Quando um canavial é totalmente cortado os roedores deslocam-se naturalmente para outros canaviais mais próximos, o que ocasiona grandes concentrações

de diversas espécies de roedores silvestres. Isto é provado pelos elevados índices de captura que chegam a ser de até 120% durante a realização de trabalhos ecoepidemiológico de hantavírus em roedores silvestres.

Supõe-se que é durante o período de colheita e transporte que os trabalhadores contraem a hantavirose, ao deitar-se diretamente no solo, no horário do almoço, para descansar nas áreas sombrias destes ambientes infestados de roedores. Acredita-se que a infecção pode ocorrer por aerossóis quando os trabalhadores encostam a face próxima à entrada das tocas dos roedores no solo do canavial ou pela penetração de vírus através das escoriações de suas mãos, quando estes as apóiam no chão sujo de excretas de roedores.



Bolomys lasiurus
Reservatório do vírus Araraquara



Vista de uma toca de *Bolomys lasiurus* em um ambiente composto de cana e braquiária

Também, observa-se que a transmissão de hantavírus é favorecida pelo descarte dos restos de comida das marmitas dos trabalhadores durante o almoço. Esta oferta de alimento condiciona os roedores a alimentarem-se nestas áreas de descanso, ocasionando grandes concentrações que levam ao aumento da prevalência de roedores infectados na natureza, devido aos encontros e brigas entre eles.

Diante da atual situação, considera-se de grande importância a oficialização de medidas de prevenção para extinção do número de casos de hantavirose associado aos trabalhadores de canaviais. Pelos argumentos expostos tais medidas alicerçam-se apenas na orientação dos trabalhadores, para que eles evitem usar áreas infestadas de roedores como locais de almoço e descanso.



Vista de uma cana roída em um canavial infestado por *Bolomys lasiurus*

Correspondência/Correspondence to:
Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 351
CEP: 01246-901- São Paulo/SP – Brasil
Tel.: (55) 11 3085-7022
e-mail: lupereira@ial.sp.gov.br

Instruções aos Autores

O **Boletim Epidemiológico Paulista (Bepa)** publicação mensal da Coordenadoria de Controle de Doenças, órgão da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (CCD/SES-SP) veicula artigos relacionados aos agravos à saúde pública ocorridos nas diversas áreas de controle, assistência e diagnóstico laboratorial do Sistema Único de Saúde de São Paulo (SUS-SP). Além de disseminar informações entre os profissionais de saúde de maneira rápida e precisa, o Bepa tem como objetivo incentivar a produção de trabalhos que subsidiem as ações de prevenção e controle de doenças na rede pública, apoiando, ainda, a atuação dos profissionais do sistema de saúde privado, promovendo a atualização e o aprimoramento de ambos.

Os documentos que podem ser publicados neste boletim estão divididos nas seguintes categorias:

1. **Artigos originais** – destinados à divulgação de resultados de pesquisa original inédita, que possam ser replicados e/ou generalizados. Devem ter de 2.000 a 4.000 palavras, excluindo tabelas, figuras e referências.

2. **Revisão** – Avaliação crítica sistematizada da literatura sobre assunto relevante à saúde pública. Devem ser descritos os procedimentos adotados, esclarecendo a delimitação e limites do tema. Extensão máxima: 5.000 palavras.

3. **Comunicações breves** – São artigos curtos destinados à divulgação de resultados de pesquisa. No máximo 1.500 palavras, uma tabela/figura e cinco referências.

4. **Informe epidemiológico** – Textos que têm por objetivo apresentar ocorrências relevantes para a saúde coletiva, bem como divulgar dados dos sistemas de informação sobre doenças e agravos. Máximo de 3.000 palavras.

5. **Informe técnico** – Trabalhos que têm por objetivo definir procedimentos, condutas e normas técnicas das ações e atividades desenvolvidas no âmbito da saúde coletiva. No máximo 5.000 palavras.

A estrutura dos textos produzidos para a publicação deverá adequar-se ao estilo Vancouver, cujas linhas gerais seguem abaixo.

• **Página de identificação** – Título do artigo, conciso e completo, em Português e Inglês; nome completo de todos os autores; indicação da instituição à qual cada autor está afiliado; indicação do autor responsável pela troca de correspondência; se subvencionado, indicar nome da agência de fomento que concedeu o auxílio e respectivo nome do processo; se foi extraído de dissertação ou tese, indicar título, ano e instituição em que foi apresentada.

• **Resumo** – Todos os textos, à exceção dos

• **Informes técnicos**, deverão ter resumo em Português e em Inglês (*Abstract*), dimensionado entre 150 palavras (**comunicações breves**) e no máximo 250 palavras (**artigos originais, revisões, atualizações e informes epidemiológicos**). Para os artigos originais, o resumo deve destacar os propósitos do estudo, procedimentos básicos adotados (seleção de sujeitos de estudo ou animais de laboratório, métodos analíticos e observacionais), principais descobertas e conclusões. Devem ser enfatizados novos e importantes aspectos do estudo ou das observações. Uma vez que os resumos são a principal parte indexada do artigo em muitos bancos de dados eletrônicos, e a única parte que alguns leitores lêem, os autores precisam lembrar que eles devem refletir, cuidadosamente, o conteúdo do artigo. Para os demais textos, o resumo deve ser narrativo, mas com as mesmas informações.

• **Descritores (unitermos ou palavras-chave)** – Seguindo-se ao resumo, devem ser indicados no mínimo três e no máximo dez descritores do conteúdo, que têm por objetivo facilitar indexações cruzadas dos textos e podem ser publicados juntamente com o resumo. Em Português, os descritores deverão ser extraídos do vocabulário "Descritores em Ciências em Saúde" (DeCS), da Bireme. Em Inglês, do "Medical Subject Headings" (Mesh). Caso não sejam encontrados descritores adequados à temática abordada, termos ou expressões de uso corrente poderão ser empregados.

• **Introdução** – Contextualiza o estudo, a natureza dos problemas tratados e sua importância. A introdução deve ser curta, definir o problema estudado, sintetizar sua importância e destacar as lacunas do conhecimento abordadas.

• **Metodologia (Métodos)** – A metodologia deve incluir informação disponível no momento em que foi escrito o plano ou protocolo do estudo; toda a informação obtida durante a condução do estudo pertence à seção de resultados. Deve conter descrição, clara e sucinta, acompanhada da respectiva citação bibliográfica, dos procedimentos adotados, a população estudada (universo e amostra), instrumentos de medida e, se aplicável, método de validação e método estatístico.

• **Resultados** – Devem ser apresentados em seqüência lógica no texto, tabelas e figuras, colocando as descobertas principais ou mais importantes primeiro. Os resultados encontrados devem ser descritos sem incluir interpretações e/ou comparações. Sempre que possível, devem ser apresentados em tabelas e figuras auto-explicativas e com análise estatística, evitando-se sua repetição no texto.

• **Discussão** – Deve enfatizar os novos e importantes aspectos do estudo e as conclusões que dele derivam, sem repetir material colocado nas seções de introdução e resultados. Deve começar com a apreciação das limitações do estudo, seguida da

• comparação com a literatura e da interpretação dos autores, apresentando, quando for o caso, novas hipóteses.

• **Conclusão** – Traz as conclusões relevantes, considerando os objetivos do trabalho e formas de continuidade. Se tais aspectos já estiverem incluídos na discussão, a conclusão não deve ser escrita.

• **Referências bibliográficas** – A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores.

- **Citações bibliográficas no texto, tabelas e figuras:** deverão ser colocadas em ordem numérica, em algarismo arábico, sobrescrito, após a citação, constando da lista de referências bibliográficas. Exemplo:

"Os fatores de risco para a infecção cardiovascular estão relacionados à imunocompetência do hospedeiro".

- **Referências bibliográficas:** devem ser numeradas consecutivamente, obedecendo à ordem em que aparecem pela primeira vez no texto, de acordo com o estilo Vancouver. A ordem de citação no texto obedecerá esta numeração. Até seis autores, citam-se todos os nomes; acima disso, apenas os seis primeiros, seguidos da expressão em Latim "et al". É recomendável não ultrapassar o número de 30 referências bibliográficas por texto.

A) Artigos de periódicos – As abreviaturas dos títulos dos periódicos citados devem estar de acordo com o *Index Medicus*, e marcadas em negrito.

Exemplo:

1. Ponce de Leon P; Valverde J e Zdero M. Preliminary studies on antigenic mimicry of *Ascaris Lumbricoidea*. *Rev Lat-amer Microbiol* 1992; 34:33-38.

2. Cunha MCN, Zorzatto JR, Castro LLC. Avaliação do uso de Medicamentos na rede pública municipal de Campo Grande, MS. *Rev Bras Cien Farmacêuticas* 2002; 38:217-27.

B) Livros A citação de livros deve seguir o exemplo abaixo:

3. Medronho RA. Geoprocessamento e saúde: uma nova abordagem do espaço no processo saúde-doença. Primeira edição. Rio de Janeiro: Fiocruz/CICT/NECT.

C) Capítulos de livro – Já ao referenciar capítulos de livros, os autores deverão adotar o modelo a seguir:

4. Arnaiz JM, Laporte JR. Promoção do uso racional de medicamentos e preparação de guias farmacológicos. In: Laporte JR, Tognoni G, Rozenfeld

S. Epidemiologia do medicamento: princípios gerais. São Paulo: Hucitec; Rio de Janeiro: Abrasco; 1989.

D) Dissertações e teses:

5. Moreira MMS. Trabalho, qualidade de vida e envelhecimento [dissertação]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública; 2000. p. 100.

E) Trabalhos de congressos, simpósios, encontros, seminários e outros:

6. Barboza et al. Descentralização das políticas públicas em DST/Aids no Estado de São Paulo. In: III Encontro do Programa de Pós-Graduação em Infecções e Saúde Pública; 2004 ago; São Paulo: Rev IAL. P. 34 [resumo 32-SC].

F) Periódicos e artigos eletrônicos:

7. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Síntese de indicadores sociais 2000. [Boletim on-line]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br> [2004 mar 5]

G) Publicações e documentos de organizações governamentais:

8. Brasil. Decreto 793, de 5 de abril de 1993. Altera os Decretos 74.170, de 10 de junho de 1974, e 79.094, de 5 de janeiro de 1977, que regulamentam, respectivamente, as Leis 5991, de 17 de janeiro de 1973, e 6360, de 23 de setembro de 1976, e dá outras providências. Brasília (DF): Diário Oficial da União; 6 abr 1993. Seção 1. p. 4397.

9. Organización Mundial de la Salud (OMS). Como investigar el uso de medicamentos en los servicios de salud. Indicadores seleccionados del uso de medicamentos. Ginebra; 1993. (DAP.93.1).

Casos não contemplados nesta instrução devem ser citados conforme indicação do Committee of Medical Journals Editors (*Grupo Vancouver*) (<http://www.cmje.org>).

Tabelas – Devem ser apresentadas em folhas separadas, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que forem citadas no texto. A cada uma deve ser atribuído um título breve, **NÃO SE UTILIZANDO TRAÇOS INTERNOS HORIZONTAIS OU VERTICAIS**. Notas explicativas devem ser colocadas no rodapé das tabelas e não no cabeçalho ou título.

Quadros – São identificados como tabelas, seguindo uma única numeração em todo o texto.

Figuras – Fotografias, desenhos, gráficos etc., citados como figuras, devem ser numerados consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram mencionados no texto, por número e título abreviado no trabalho. As legendas devem ser apresentadas em folha à parte; as ilustrações devem ser suficientemente claras para permitir sua reprodução. Não são permitidas figuras que representem os mesmos dados.



**SECRETARIA
DA SAÚDE**

