

## PESQUISA DA INFECÇÃO NATURAL POR *YERSINIA PESTIS*, EM PULICÍDEOS PROVENIENTES DE FOCOS PESTOSOS DO NORDESTE DO BRASIL.

Darci Pascoal Brasil<sup>1</sup>, Francisco Gomes de Carvalho<sup>2</sup>, Célio Rodrigues de Almeida<sup>1</sup>  
e Alzira Maria Paiva de Almeida<sup>1</sup>.

*Foram avaliados três processos de acondicionamento e transporte de pulgas, objetivando análise bacteriológica para isolamento da Yersinia pestis. As três abordagens testadas foram: pulgas vivas em tubos de ensaio com tiras dobradas de papel de filtro; pulgas em solução salina; macerados de pulgas em meio de Cary-Blair. Os dois últimos métodos foram quase iguais e superiores ao primeiro. Foram analisadas pelas três técnicas, um total de 29.512 "pools" de pulicídeos provenientes de focos de peste do Nordeste do Brasil no período de 1966 a 1982. Deste total, 236 (0,80%) dos "pools" foram positivos por cultura e/ou inoculação em animais sensíveis.*

Palavras-chaves: *Yersinia pestis*. Pulicídeos. Vigilância. Controle da peste.

A peste tem sido um sério problema para a humanidade desde a mais remota antiguidade<sup>15</sup>. Atualmente, apesar dos avanços científicos e tecnológicos a infecção persiste nos focos naturais de quase todos os continentes<sup>22</sup>. No Brasil há vários focos disseminados na Região Nordeste sendo os mais ativos os dos Estados do Ceará, Pernambuco, Paraíba e Bahia<sup>1 3 4 5 8</sup>, além de um pequeno foco na Serra dos Órgãos, no Estado do Rio de Janeiro<sup>6</sup>. Sendo uma das doenças de notificação obrigatória a nível internacional e sujeita a quarentena<sup>21</sup>, os países que têm peste em seus territórios, devem envidar todos os esforços possíveis para evitar a propagação da infecção pelos roedores e seus ectoparasitos. O Comitê de Peritos em Pestes da OMS<sup>23</sup> recomenda a vigilância permanente nos focos e nas áreas com história de infecção no passado. Capturas sistemáticas e exames regulares dos roedores e seus ectoparasitos, permitem acompanhar a evolução das atividades da infecção.

Neste trabalho avalia-se a pesquisa de *Yersinia pestis* nos pulicídeos dos focos de peste do Nordeste do Brasil no período de 1966 a 1982 e os métodos empregados para o transporte de pulgas com vistas ao isolamento do bacilo, possibilitando que medidas profiláticas sejam acionadas.

### MATERIAL E MÉTODOS

As pulgas foram coletadas durante os trabalhos do Plano Piloto de Peste em Exu<sup>10</sup> e pelas equipes do

Laboratório de Peste do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães e da Campanha Contra a Peste das Diretorias Regionais da SUCAM/MS dos Estados de Pernambuco, Paraíba, Ceará, Alagoas e Bahia.

No período de 1966 a 1974, os pulicídeos eram levados vivos ao laboratório em tiras dobradas de papel de filtro, no interior de pequenos frascos de vidro ou tubos de ensaio fechados com gaze. A identificação específica dos pulicídeos, as análises bacteriológicas e/ou inoculações, em animais sensíveis, eram realizadas nas primeiras 24 horas após a coleta.

No período de 1975 a 1982, foram adotados os processos de conservação dos pulicídeos em solução salina a 2,5%<sup>9</sup> ou semeio de macerados de "pools" de pulicídeos, no meio de Cary & Blair<sup>13 14 20</sup>, para transporte e análise em um laboratório central. O número de pulgas de cada "pool" variava de 1 a 20, entretanto houve ocasiões em que esse limite foi ultrapassado. Os pulicídeos eram agrupados por espécie e hospedeiro ou origem. Os "pools", conservados em salina, eram lavados por 10 minutos em álcool etílico a 70% e depois em salina (0,85%) estéril, sendo em seguida macerados estérilmente com bastão de vidro, diluídos em algumas gotas de salina e semeados e/ou inoculados em animais sensíveis à peste<sup>18</sup> (camundongos ou *Bolomys lasiurus* = *Zygodontomys lasiurus pixuna*). As culturas eram incubadas a 37°C durante 48 horas e colônias com características de *Y. pestis*, eram repicadas em caldo peptonado para teste com o bacteriófago antipestoso e isolamento da cepa<sup>17</sup>.

Os animais inoculados ficavam em observação e os que morriam eram processados conforme descrito por Almeida e cols<sup>7</sup> seguindo a metodologia de Baltazard e cols<sup>11</sup> e Bahmanyar & Cavanaugh<sup>9</sup>. Os "pools" de pulgas, macerados e semeados para observação e transporte no meio de Cary & Blair, eram também analisados por cultivo e/ou inoculações.

1. Laboratório de Peste. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, PE.

2. Laboratório de Peste. 56230 Exu, PE.

Endereço para correspondência: Dr. Darci Pascoal Brasil. Caixa Postal 7472- 50730 Recife, PE, Brasil.

Tabela 1 - Distribuição por foco dos "pools" de pulicídeos analisados e infectados no período de 1966 a 1982

Período	Focos																			Total Pos	%			
	Chapada do Araripe			Triunfo			Chapada da Borborema						Norte do Ceará											
	Exam	Pos	%	Exam	Pos	%	Agreste/PE			Encosta Leste/PB			Vertente Sul/AL			Exam	Pos	%						
							Exam	Pos	%	Exam	Pos	%	Exam	Pos	%									
1966	231	1	0,43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	231	1	0,43			
1967	1889	56	2,96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1889	56	2,96			
1968	1723	19	1,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1723	19	1,10			
1969	1070	29	2,71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1070	29	2,71			
1970	756	32	4,23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	756	32	4,23			
1971	1328	29	2,18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1328	29	2,18			
1972	897	11	1,23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	114	1	0,88	-	1011	12	1,19			
1973	484	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	484	-	-			
1974	859	35	4,07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	859	35	4,07			
1975	395	15	3,80	71	-	-	1134	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1600	15	0,93			
1976	142	1	0,70	106	-	-	755	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1003	1	0,10			
1977	232	-	-	127	-	-	442	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	141	-	942	-	-		
1978	606	-	-	254	-	-	599	-	-	13	-	-	113	-	-	-	-	-	1078	-	2663	-	-	
1979	1287	-	-	315	2	0,63	596	5	0,84	-	-	-	398	-	-	-	-	-	1319	-	3915	7	0,18	
1980	1755	-	-	303	-	-	516	-	-	221	-	-	443	-	-	-	-	-	1104	-	4342	-	-	
1981	534	-	-	526	-	-	482	-	-	320	-	-	295	-	-	-	-	-	649	-	2806	-	-	
1982	178	-	-	406	-	-	1156	-	-	683	-	-	244	-	-	-	-	-	223	-	2890	-	-	
Total	14366	228	1,59	2108	2	0,09	5680	5	0,08	1237	-	-	1493	-	-	-	-	-	4628	1	0,02	29512	236	0,80

Exam = Número de "pools" de pulicídeos examinados. Pos = Número de "pools" de pulicídeos positivos.

A fim de avaliar a eficácia dos métodos recomendados para o transporte de pulgas para isolamento da *Y. pestis*, 80 "pools" de *Xenopsylla cheopis* (5 pulgas por "pool") colonizadas e infectadas no laboratório com a cepa P.PB 862, segundo a metodologia de Baltazard e Eftekhari<sup>11</sup> foram acondicionados nas seguintes condições: 20 "pools" em tiras dobradas de papel de filtro, colocados em tubos de ensaio mantidos a temperatura ambiente e 20 "pools" a 4°C, 20 "pools" em solução salina a 2,5% e 20 "pools" macerados e semeados no meio de Cary & Blair. Dois "pools" conservados em cada uma das condições citadas, foram analisados por cultura em gelose e MacConkey agar a intervalos regulares até 90 dias.

## RESULTADOS

A Tabela 1 mostra a distribuição por foco dos "pools" de pulicídeos analisados e infectados no período de 1966 a 1982 e observa-se que a *Y. pestis* foi encontrada em 236 (0,80%) dos 29.512 "pools" examinados.

A distribuição específica dos pulicídeos examinados e infectados, no período de 1966 a 1982, encontra-se na Tabela 2 e verifica-se que o número de "pools" de *Polygenis (Polygenis bolshi jordani e, Polygenis tripus)* do Foco da Chapada do Araripe infectados pela *Y. pestis*, foi significativamente maior. Quanto às pulgas *Xenopsylla*, *Ctenocephalides* e *Pulex irritans*, foram encontradas infectadas apenas no foco da Chapada do Araripe, provavelmente em decorrência da metodologia empregada nas coletas e ao processamento imediato.

Os resultados dos trabalhos realizados sobre a conservação de pulicídeos para transporte e análise posterior, encontram-se na Tabela 3. A *Y. pestis* só foi recuperada nos dois primeiros dias, entre os pulicídeos conservados em papel de filtro à temperatura ambiente, e até 15 dias quando a conservação foi realizada a 4°C. Após esses períodos, o bacilo desaparece das pulgas e não se obtém nenhum crescimento nas culturas. Em pulgas conservadas em solução salina a 2,5% ou maceradas e colocadas no meio de Cary & Blair, a *Y. pestis* foi encontrada durante todo o período de experimentos. Nessas condições algumas amostras que resultaram negativas apresentavam crescimento abundante de outras bactérias, principalmente não fermentadoras, e bacilos esporulados gram positivos. Estas bactérias também são freqüentemente encontradas nas amostras recebidas dos campos para exames (dados não apresentados).

## DISCUSSÃO

A maioria das pulgas infectadas, era originária do foco da Chapada do Araripe/PE, no período de 1966 a 1976. Avaliando os resultados da pesquisa da *Y. pestis* nos roedores dos focos do Nordeste do Brasil no período de 1966 a 1982, Almeida e cols<sup>2</sup>, também observaram que a maioria dos animais infectados era proveniente do Foco da Chapada do Araripe, no período de 1966 a 1974. Nesse foco, o bacilo da peste foi encontrado entre os pulicídeos quase ininterruptamente, no período de 1966 a 1976, exceto no ano de 1973 quando também não foi detectado nos roedores ou seres humanos<sup>1</sup>. Depois de 1976, não foi mais encontrado entre os pulicídeos desse foco, apesar da

Tabela 2 – Distribuição específica dos “pools” de pulicídeos examinados e infectados no período de 1966 a 1982.

Focos	Pulicídeos													
	Polyg		Xeno		Cteno		Pulex		Adorat		S/inform		Total	
	Exam	Pos	Exam	Pos	Exam	Pos	Exam	Pos	Exam	Pos	Exam	Pos	Exam	Pos
Chapada do Araripe	9101	203	1731	19	569	1	2788	5	30	-	147	-	14366	228
Triunfo	1356	2	518	-	56	-	132	-	-	-	46	-	2108	2
Agreste/PE	4129	5	458	-	310	-	729	-	47	-	7	-	5680	5
Encosta Leste/PB	190	-	14	-	20	-	53	-	1	-	959	-	1237	-
Vertente Sul/AL	647	-	654	-	63	-	128	-	1	-	-	-	1493	-
Norte do Ceará	2032	1	1373	-	247	-	638	-	14	-	324	-	4628	1
Total	17455	211	4748	19	1265	1	4468	5	93	-	1483	-	29512	236

Polyg = *Polygenis bohlsi-jordani* e *Polygenis tripus*; Xeno = *Xenopsylla* sp; Cteno = *Ctenocephalides* sp.; Pulex = *Pulex irritans*; Adorat = *Adoratopsylla a. antiquorum*; S/inform = sem informação; Exam = examinados; Pos = positivos.

Tabela 3 – Avaliação dos processos de conservação e transporte de pulicídeos para isolamento da *Yersinia pestis*.

Dias	Processo de conservação	Papel filtro TA		Papel filtro + 4°C		Salina 2,5% TA		Cary-Blair TA	
		Nº de “pools”		Nº de “pools”		Nº de “pools”		Nº de “pools”	
		Exam	Pos	Exam	Pos	Exam	Pos	Exam	Pos
1		2	1	2	2	2	2	2	1
2		2	2	2	1	2	2	2	2
5		2	-	2	2	2	2	2	1
6		2	-	2	2	2	2	2	1
7		2	-	2	2	2	2	2	-
8		2	-	2	2	2	2	2	2
15		2	-	2	1	2	1	2	1
30		2	-	2	-	2	2	2	1
60		2	-	2	-	2	1	2	2
90		2	-	2	-	2	1	2	2

TA = Temperatura ambiente; Exam = Número de “pools” (5 pulgas por “pools”) examinados; Pos = Número de “pools” positivos.

ocorrência de peste humana e de roedores<sup>1</sup>. Nos outros focos, a presença da *Y. pestis* foi observada entre os pulicídeos apenas no ano de 1979, no Foco de Triunfo, associada à peste humana e de roedores<sup>1 8</sup> e no agreste pernambucano, que faz parte do Foco da Chapada da Borborema, não tendo sido encontrada nos pulicídeos das outras áreas estudadas desse foco (Encosta Leste/PB e Vertente Sul/AL), embora tenha sido encontrada nos roedores originados da Encosta Leste/PB<sup>1 2</sup>. No Foco do Norte do Ceará, o bacilo da peste não foi encontrado entre os pulicídeos no período de 1976 a 1982, apesar da ocorrência de peste humana e de roedores<sup>1 8</sup>. Conforme foi observado em relação à pesquisa da *Y. pestis* entre os roedores<sup>2</sup>, as diferenças nos percentuais de positividade obtidos entre os pulicídeos dos diversos focos, podem ser atribuídas em grande parte à metodologia empregada nas coletas dos espécimes para exames de laboratório. Como no

período de 1966 a 1974 as pulgas eram processadas no dia da coleta, o bacilo podia ser detectado no prazo de 24 a 96 horas pelo teste rápido com o bacteriófago antipestoso<sup>17</sup>, o que permitia acompanhar os rastilhos epizooticos, concentrando as coletas nos locais infectados e obter maior quantidade de espécimes infectados. Após 1975, tendo sido adotado o sistema de enviar os espécimes para exames nos laboratórios centrais, as pulgas passaram a ser analisadas depois de várias semanas ou meses de coletadas. Por conseguinte, ao invés de serem orientadas pelos resultados dos exames de laboratório, as coletas foram realizadas segundo um cronograma préfixado anualmente, o que impossibilitava o acompanhamento dos rastilhos epizooticos.

*Polygenis* sp. parasita principalmente os roedores silvestres mas pode também ser encontrada nos

roedores comensais e, embora raramente, no homem e livres no piso de suas moradias<sup>16 19</sup>. Karimi e cols<sup>19</sup> demonstraram experimentalmente que a *Polygenis sp.* é capaz de picar o homem e possui grande capacidade vetora. A *Xenopsylla* é o principal parasita dos roedores comensais (*Rattus rattus sp*) porém também é encontrada entre os roedores silvestres, no homem, ou livres no solo de suas moradias<sup>17</sup>. Segundo Karimi e cols<sup>17</sup>, surtos humanos familiares, quando vários membros de uma família são infectados no mesmo período, são geralmente resultado da contaminação pelas *Xenopsylla* liberadas nas habitações após a morte dos ratos hospedeiros infectados, enquanto que os casos humanos isolados, podem ser atribuídos à contaminação nos campos pelas pulgas infectadas dos roedores silvestres. Karimi e cols<sup>17</sup> mostraram que a *Pulex* e *Ctenocephalides* são os pulicídeos mais numerosos nas habitações do Foco da Chapada do Araripe assim como sobre os seres humanos e também atribuem importância à estas espécies nas contaminações intradomiciliares pela peste. A *Adoratopsylla*, principal ectoparasita dos carnívoros silvestres (Marsupiais), não foi encontrada infectada, apesar da infecção haver sido detectada nos animais hospedeiros<sup>1</sup>.

Embora reconheçam a eficácia de alguns métodos de conservação e transporte da *Y. pestis*<sup>13 14 24</sup>, Almeida e cols<sup>2</sup> salientam a importância da rapidez das análises das amostras coletadas para a pesquisa da *Y. pestis*, no rastreamento da peste. De maneira semelhante ao que foi observado entre os roedores, somente a análise dos pulicídeos logo após a coleta, como foi realizado no foco da Chapada do Araripe/PE, permite acompanhar os rastilhos epizooticos e possibilita o acionamento das medidas de profilaxia ofensiva (despulsização das habitações) em tempo oportuno.

## SUMMARY

Three different containment transport processes of fleas were evaluated as an approach to the bacteriologic isolation of *Yersinia pestis*. The three methods employed were: live fleas in glass tubes containing pieces of wrapped filter paper; dead fleas in saline solution; and macerated fleas in Cary-Blair culture medium. The two latter methods were almost equal and superior to the first method. A total of 29512 flea pools, from plague foci in Northeast Brazil collected during 1966 to 1982 were evaluated by the three methods. Among these samples, 236 (0.80%) flea pools were positive with regard to bacteriological cultivation and/or infection of susceptible animals.

Key-words: *Yersinia pestis*. Vector Control fleas. Plague surveillance.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almeida AMP, Brasil DP, Carvalho FG, Almeida CR. Isolamento da *Yersinia pestis* nos focos pestosos do Nordeste do Brasil no período de 1966 a 1982. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 27: 207-218, 1985a.
2. Almeida AMP, Brasil DP, Carvalho FG, Almeida CR. Pesquisa de *Yersinia pestis* em roedores e outros pequenos mamíferos nos focos pestosos do Nordeste do Brasil no período de 1966 a 1982. Revista de Saúde Pública, São Paulo 21:265-267, 1987.
3. Almeida AMP, Brasil DP, Leal NC, Melo MEB, Rego RVB, Almeida, CR. Estudos bacteriológicos e sorológicos de um surto de peste no Estado da Paraíba, Brasil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 84:249-256, 1989.
4. Almeida AMP, Brasil DP, Melo MEB, Leal NC, Almeida CR. Detecção da peste no Estado da Bahia. Revista de Microbiologia, São Paulo 16:232-233, 1985.
5. Almeida AMP, Brasil DP, Melo MEB, Leal NC, Almeida CR. Importância dos carnívoros domésticos (cães e gatos) na epidemiologia da peste nos focos do Nordeste do Brasil. Cadernos de Saúde Pública, RJ 1:49-55, 1988.
6. Almeida AMP, Brasil DP, Melo MEB, Nakasaua M, Almeida CR. Demonstração de atividade pestosa no foco da Serra dos Órgãos (Rio de Janeiro, Brasil) no período de 1983 a 1984, através de exames sorológicos em roedores. Revista de Microbiologia, São Paulo 16:280-281, 1985.
7. Almeida CR, Almeida AMP, Brasil DP, Dantas Sobrinho J, Leal MA. Estudo do roedor *Akodon arviculoides*, Wagner, 1842 (*Cricetidae*). Importância nos focos pestosos do Brasil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 81:407-414, 1986.
8. Almeida CR, Almeida AMP, Vieira JB, Guida U, Butler T. Plague in Brazil during two years of bacteriological and serological surveillance. Bulletin of the World Health Organization 59:591-597, 1981.
9. Bahmanyar M, Cavanaugh DC. Plague Manual. World Health Organization, Geneve, 1976.
10. Baltazard M. Viagem de Estudos ao Brasil para a organização de um projeto de pesquisa sobre a peste. Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais 20:335-366, 1968.
11. Baltazard M, Davis DHS, Devignat R, Girard D, Gohar MA, Kartman L, Meyer KF, Parker MT, Pollitzer R, Prince FM, Quan SF, Wagle P. Recommended laboratory methods for the diagnosis of plague. Bulletin of the World Health Organization 14:457-509, 1956.
12. Baltazard M, Eftekhari M. Technique de récolte, de manipulation et d'élevage des puces de rongeurs. Bulletin de la Organization Mondiale de la Santé 16:436-440, 1957.
13. Cary SG, Blair EB. New transport medium for shipment of clinical specimens. I. Fecal specimens. Journal of Bacteriology 88:96-98, 1964.
14. Cavanaugh DC, Vivona S, Do-Van-Quy, Gibson, FL, Deuber GL, Rust Jr JH. A transport medium for specimens containing *P. pestis*. Bulletin of the World Health Organization 37:455-459, 1967.
15. Coura JR, Almeida CR, Almeida AMP. Peste in: Amato

- Neto V, Baldy JLS (eds). *Doenças Transmissíveis*. Savier. São Paulo 3ª ed. p. 691-698, 1989.
16. Guimarães LR. Contribuição à epidemiologia da peste endêmica no Nordeste do Brasil e Estado da Bahia. Estudo das pulgas encontradas nessa região. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais* 24:95-163, 1972.
  17. Karimi Y. Diagnosticque rapide de l'infection pesteuse au laboratoire. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 1:45-48, 1978.
  18. Karimi Y, Almeida CR, Almeida AMP. La peste expérimentale chez les rongeurs du Brésil. Dédutions Épidémiologiques. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 67:591-601 1974
  19. Karimi Y, Eftekhari M, Almeida CR. Sur l'écologie des puces impliquées dans l'épidémiologie de la peste et le rôle éventuel de certains insectes hématophages dans son processus au Nord-Est du Brésil. *Bulletin de-la Société de Pathologie Exotique* 67:583-591, 1974.
  20. Mello MT, Paracampo H, Santos DA. Emprego do meio de Cary Blair para conservação e transporte de material suspeito de peste em zonas rurais. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais* 21:767-773, 1969.
  21. Organización Mundial de la Salud. Eglamento Sanitario Internacional. Ginebra, 1974.
  22. Poland JD, Barnes A. Plague. In: Steele JH (ed) *CRC Handbook Series in Zoonoses. Section A: Bacterial, Rickettsial and Mycotic Diseases*. Boca Raton, CRC Press p. 515-558, 1979.
  23. World Health Organization. Technical Report Series. WHO Expert Committee on Plague. Fourth Report 447:23-25, 1970.
  24. Zebral AA, Costa GA. Eficácia de alguns meios de cultura na conservação de amostras de *Yersinia pestis*. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais* 31:5-17, 1969.