



Tularémia: uma zoonose emergente?

Carina Carvalho¹, Sofia Núncio¹, Isabel Lopes de Carvalho^{1,2}

isabel.carvalho@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório Nacional de Referência de Doenças Infecciosas Transmitidas por Vetores; (2) Unidade de Resposta a Emergências e Biopreparação. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

Introdução

A tularémia é uma zoonose causada pela bactéria *Francisella tularensis*, classificada pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) como agente de Classe A (1,2).

F. tularensis foi isolada pela primeira vez em 1912 na Califórnia por George McCoy e Charles Chapin e, desde então, detetada em várias espécies silvestres (1,3). Os lagomorfos e roedores são considerados os principais reservatórios de *F. tularensis* na natureza e assumem particular relevância face ao potencial risco de transmissão ao Homem, quer por contacto direto quer através dos vetores competentes, como carraças e mosquitos (4). A espécie *F. tularensis* é a mais patogénica do género *Francisella* e engloba três subespécies (*F. tularensis* subsp. *tularensis*, *F. tularensis* subsp. *holarctica* e *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*) com distribuições geográficas e graus de virulência distintos (5). *F. novicida* é reconhecida como uma quarta subespécie, embora esta classificação não tenha sido oficialmente adotada (6,7). Apenas as subespécies *F. tularensis* subsp. *tularensis* (Tipo A) e *F. tularensis* subsp. *holarctica* (Tipo B) têm uma distribuição geográfica expressiva na população humana (5).

A principal via de infeção para o Homem é a cutânea. Outras vias incluem a conjuntiva ocular, as mucosas da boca e nariz e a via gastrointestinal. O período de incubação é geralmente de três a cinco dias e a doença tem início agudo com febre (38-40°C), cefaleias, fadiga, mialgias e arrepios de frio. Estão descritas várias formas clínicas de tularémia: ulceroglandular, glandular, oculoglandular, orofaríngea, pneumónica, tifoidal e séptica. As duas primeiras são as mais comuns e encontram-se frequentemente associadas à picada de artrópodes ou ao contato com animais infetados (1,8).

Relativamente ao diagnóstico laboratorial, a cultura é o método de referência para o diagnóstico da tularémia e é realizada em condições de biossegurança de nível 3 (BSL3) (1,8). Os métodos moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido aplicados com sucesso na identificação rápida e na classificação de *Francisella*, quando a cultura não é possível ou é negativa. O PCR em tempo real TaqMan™ (rtPCR) apresenta elevada especificidade e sensibilidade e baseia-se na amplificação de três sequências-alvo, nomeadamente o gene *tul4*, o gene *fopA* e o elemento de inserção *ISFTu2*. O rtPCR foi também desenvolvido para diferenciar subespécies e está direcionado para uma região variável designada “ilha de patogenicidade” (9,10). Para genotipagem usam-se métodos mais discriminatórios como o MLVA (*Multiple-locus Variable Number Tandem Repeat Analysis*) (11).

A vigilância epidemiológica da tularémia existe na Europa desde 2003 (Decisão n.º 2003/534/CE) (12). Apesar de ser considerada uma doença pouco frequente têm sido notificados surtos recentes em vários países, nomeadamente em Espanha, França, na Escandinávia, nos Balcãs e na Hungria e casos esporádicos na Áustria, em Itália ou no Reino Unido (13).

Desde 1998, o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) disponibiliza o diagnóstico laboratorial desta patologia. Em Portugal, *F. tularensis* subsp. *holarctica* foi detetada pela primeira vez em 2007, por métodos moleculares, numa amostra humana e num ixodídeo (14). Dentro desta linha de investigação têm vindo a ser realizados vários estudos epidemiológicos com o intuito de esclarecer a prevalência desta doença em Portugal.

Objetivo

Descrever a frequência de *F. tularensis* em Portugal, em amostras humanas, artrópodes vetores e potenciais reservatórios como os lagomorfos silvestres entre 1 de janeiro de 2011 e 15 de junho de 2015.

Materiais e métodos

No período em estudo foram estudadas 5372 amostras de diferentes origens. O tipo e número de amostras, período de amostragem espécies identificadas e técnicas laboratoriais realizadas constam do quadro 1.

Quadro 1: Descrição das amostras analisadas e técnicas laboratoriais realizadas no INSA, 1 de janeiro de 2011 - 15 de junho de 2015.

| Tipo de amostras | Nº amostras | Período de amostragem | Nº espécies identificadas | Origem geográfica | Método de extração de DNA | Método de deteção | Método de tipificação |
|----------------------------|-------------|------------------------------|---------------------------|--|--|---------------------------------------|-----------------------|
| Humanas | 93 | 2011-Junho 2015 | - | Território nacional | Coluna ¹ | Microaglutinação <i>in house</i> /PCR | - |
| Mosquitos | 4949 | 2007-2010 | 12 ^a | Território nacional | Coluna ¹ ; fenol: clorofórmio | PCR | - |
| Carraças | 237 | | 7 ^b | Distritos de Vila Real, Bragança e Évora | Coluna ¹ | PCR | <i>sdhA</i> , VNTR |
| Lagomorfos (Fígado e baço) | 93 | Época cinegética 2011 e 2012 | 2 ^c | Distrito de Évora | Coluna ¹ | rtPCR | rtPCR |

a) 12 espécies pertencentes a 5 géneros: *Culx* spp., *Ochlerotatus* spp., *Anopheles* spp., *Culiseta* spp., *Aedes* spp. (número muito limitado de espécimens *Aedes aegypti* da Ilha da Madeira); b) 7 espécies pertencentes a 4 géneros *Dermacentor* spp., *Ixodes* spp., *Rhipicephalus* spp., *Hyalomma* spp.; c) 2 *Oryctolagus cuniculus*; *Lepus granatensis*; 1) *Dneasy Blood and Tissue kit* (Qiagen, Hilden, Germany).

Resultados e discussão

Entre 1 de janeiro de 2011 e 15 de junho de 2015, o INSA recebeu 93 amostras humanas para confirmação de diagnóstico de infeção por *Francisella tularensis* (tabela 1). Todas as amostras analisadas foram negativas, não havendo também casos clínicos notificados em Portugal desde 2011.

De um total de 237 carraças estudadas, 15 espécimens (6.33%) das espécies *Dermacentor reticulatus*, *D. marginatus*, *Hyalomma lusitanicum*, *I. ricinus* e *R. sanguineus* foram positivas para a presença de *F. tularensis* subsp. *holarctica*, sugerindo que, no nosso país, as carraças possam ser os vetores mais importante desta zoonose, tal como acontece na maioria dos países europeus (15). Os 4949 mosquitos investigados foram negativos para a presença de *F. tularensis*, indicando que estes artrópodes não parecem desempenhar um papel relevante na transmissão da tularémia ao homem em Portugal (16).

F. tularensis subsp. *holarctica* foi recentemente detetada em lagomorfos silvestres pela primeira vez em Portugal. Das 93 amostras analisadas, seis (6.45%) foram positivas para a presença desta

bactéria (15). Os lagomorfos são indicadores biológicos de tularémia, estando diretamente implicados na transmissão da doença ao homem, uma vez que estão entre as espécies cinegéticas mais caçadas na Península Ibérica. Neste contexto, o papel dos lagomorfos como reservatório e potencial veículo de transmissão de tularémia necessita de ser clarificado continuando a ser objeto de estudo.

Tabela 1: Diagnóstico laboratorial de infeção por *Francisella tularensis* realizado no INSA, 1 de janeiro de 2011 - 15 junho de 2015.

| Método | Ano de diagnóstico | | | | |
|---|--------------------|------|------|------|------|
| | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 |
| Serologia (microaglutinação <i>in house</i>) | 21 | 13 | 14 | 25 | 5 |
| PCR | 12 | 1 | 2 | 0 | 0 |



Conclusões

Apesar da tularémia ser considerada uma doença pouco frequente, a elevada infeciosidade de *F. tularensis* e a sua fácil dispersão por aërossóis ou através de água contaminada tornam este agente etiológico numa potencial arma de bioterrorismo (8). Acresce que a sua ampla distribuição geográfica e emergência, atualmente observada na Europa, conduziram ao reforço da vigilância e do conhecimento sobre a doença, sobretudo entre as populações de risco, nomeadamente caçadores e profissionais de saúde (3). Assim, e do ponto de vista de saúde pública, o potencial impacto desta doença enquanto zoonose emergente não deve ser negligenciado. A par da sensibilização junto às populações de risco, a vigilância da tularémia nos animais sentinela é essencial para a monitorização e prevenção de eventuais surtos epidémicos, sobretudo em regiões onde o contato com potenciais reservatórios e vetores é mais frequente.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Equipa REVIVE – Rede de Vigilância de Vetores, à FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia (projeto PTDC/SAU-ESA/104947/2008; C. Carvalho, bolsreira de doutoramento SFRH/BD/79225/2011) e à Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 6th ed. New York : Elsevier/Churchill Livingstone, 2005. Vol 2, pp. 2674-83.
- (2) Centers for Disease Control and Prevention. Emergency Preparedness and Response [Em linha]. [consult. 9/7/2015] <http://emergency.cdc.gov/firsthours/bioterrorism.asp>
- (3) Carvalho CL, Lopes de Carvalho I, Zé-Zé L, et al. Tularaemia: a challenging zoonosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2014;37(2):85-96. Review.
- (4) Gyuranecz M, Szeredi L, Makrai L, et al. Tularemia of European Brown Hare (*Lepus europaeus*): a pathological, histopathological, and immunohistochemical study. *Vet Pathol*. 2010;47(5):958-63. <http://vet.sagepub.com/content/47/5/958.full.pdf+html>
- (5) Vogler AJ, Birdsell D, Price LB, et al. Phylogeography of *Francisella tularensis*: global expansion of a highly fit clone. *J Bacteriol*. 2009;191(8):2474-84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2668398/>
- (6) Johansson A, Celli J, Conlan W, et al. Objections to the transfer of *Francisella novicida* to the subspecies rank of *Francisella tularensis*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010;60(Pt 8):1717-8.
- (7) Busse HJ, Huber B, Anda P, et al. Objections to the transfer of *Francisella novicida* to the subspecies rank of *Francisella tularensis* - response to Johansson et al. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010;60(Pt 8):1718-20.
- (8) WHO Guidelines on Tularaemia. Geneva: World Health Organization, 2007, p. 115 http://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_EPR_2007_7.pdf
- (9) Versage JL, Severin DD, Chu MC, et al. Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. *J Clin Microbiol*. 2003;41(12):5492-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC309004/>
- (10) Kugeler KJ, Pappert R, Zhou Y, et al. Real-time PCR for *Francisella tularensis* types A and B. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(11):1799-801. http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/12/11/06-0629_article
- (11) Vogler AJ, Birdsell D, Wagner DM, et al. An optimized, multiplexed multi-locus variable-number tandem repeat analysis system for genotyping *Francisella tularensis*. *Lett Appl Microbiol*. 2009;48(1):140-4. Epub 2008 Nov 19.
- (12) União Europeia. Comissão das Comunidades Europeias. Decisão n.º 2003/534/CE, de 17 de Julho de 2003 que altera a Decisão n.º 2119/98/CE do Parlamento Europeu e do Conselho e a Decisão n.º 2000/96/CE no que diz respeito às doenças transmissíveis enumeradas naquelas decisões e que altera a Decisão n.º 2002/253/CE no que diz respeito às definições de casos de doenças transmissíveis. JO. 23.7.2003: L 184/35-39. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003D0534&from=PT>
- (13) European Center for Disease Control and Prevention. Annual Epidemiologic Report: reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC, 2013, pp. 119-121. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Annual-Epidemiological-Report-2012.pdf>
- (14) de Carvalho IL, Escudero R, Garcia-Amil C, et al. *Francisella tularensis*, Portugal. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(4):666-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2725955/>
- (15) Lopes de Carvalho I, Toledo A, Carvalho CL, et al. *Francisella* species in ticks and animals, Iberian Peninsula. *Ticks Tick Borne Dis*. 2015 (em publicação).
- (16) Carvalho CL, Zé-Zé L, Duarte EL, et al. Screening of mosquitoes as vectors of *F. tularensis* in Portugal. 7th International Conference on Tularemia, Breckenridge, Colorado, 2012.