

**Secretaria de Estado da Saúde
Coordenadoria de Controle de Doenças
Instituto Adolfo Lutz**

**Curso de Especialização
Vigilância Laboratorial em Saúde Pública**

**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA
FEBRE MACULOSA: UMA BREVE
REVISÃO SOBRE A SITUAÇÃO ATUAL
E PERSPECTIVAS FUTURAS**

São Paulo

2019

Michellin Pereira de Albuquerque

**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA
FEBRE MACULOSA: UMA BREVE
REVISÃO SOBRE A SITUAÇÃO ATUAL
E PERSPECTIVAS FUTURAS**

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Adolfo Lutz- Unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP-Doutor Antônio Guilherme de Souza como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública

Orientador: Titulação e nome do orientador Prof^a.Dr^a. Fabiana Cristina dos Santos Pereira

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Albuquerque, Michellin Pereira de
Diagnóstico Laboratorial da Febre Maculosa: Uma Breve
Revisão da Situação Atual e Perspectivas Futuras./ Michellin Pereira de
Albuquerque– São Paulo, 2019.
30 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização-Vigilância
Laboratorial em Saúde Pública)-Secretaria de Estado da Saúde de São
Paulo, CEFOR/SUS-SP, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2018.

Área de concentração: Vigilância Laboratorial em Zoonoses
Virais e Rickettsioses
Orientação: Prof. Dr. Fabiana Cristina Pereira dos Santos

1- Febre Maculosa; 2- Rickettsia rickettsii; 3-
Imunofluorescência Indireta; 4- PCR; 5- Isolamento

SES/CEFOR/IAL-4/2019

AGRADECIMENTOS

Muitos são os motivos para agradecer, e primeiramente agradeço a Deus que me sustentou durante esse período. Ele não só cuidou de mim como também me deu forças vencer cada obstáculo. Todo mérito seja dado a Ele por chegar até aqui.

Em segundo lugar agradeço aos meus pais, Antonio e Cleusir, que sempre contribuíram para minha formação. Sem o apoio deles não seria possível chegar até aqui. Obrigada pai e mãe por tudo o que fizeram e ainda fazem por mim.

Agradeço a minha orientadora Dr^a Fabiana Cristina Pereira Santos, pela orientação e por ensinar todo o trabalho realizado no Laboratório Riquetsia. Além de me apoiar em atividades extracurriculares e complementares ao Serviço de Vigilância, agradeço por contribuir em minha formação profissional e por despertar o desejo de seguir na carreira acadêmica.

À Nilcéia Arruda e Silvia Colombo, do Laboratório de Riquetsia, meus sinceros agradecimentos também por contribuírem com a formação profissional.

Também a agradeço a todos do Núcleo de Doenças de Transmissão Vetorial por repassarem todo o conhecimento. Especialmente a Ursula Kaigawa, Giovana Caleiro, Laís Sampaio e Paloma Facioli que tiveram paciência para me ensinar todo o trabalho que realizam no Núcleo e principalmente pelo apoio durante esse período. Não esquecendo do Fernando, que me auxiliou na utilização do programa Qgis.

Agradeço as amigas que fiz durante esse período de especialização. Rosiane Canella, Lia Cunha, Vanessa Corrêa, Luana Prado, Natasha Radmila e Fúlvia, foi muito importante o apoio de vocês e auxílio durante o período de aulas.

À Carla Adriana e Grazielle Sanches, que dividiram muitas lutas comigo e também me auxiliaram nos períodos de aulas. Cada uma contribuiu muito durante essa trajetória.

À todos que também contribuíram de forma direta ou indireta pela conclusão deste programa, meus agradecimentos infinitos!

RESUMO

No Brasil, a Febre Maculosa Brasileira (FMB) foi descrita em 1929. Trata-se de uma doença infecciosa febril aguda de caráter zoonótico, transmitida por carrapatos do gênero *Amblyoma* e causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii*. Neste trabalho foi realizada uma revisão bibliográfica sobre o diagnóstico laboratorial da FMB, apresentando a situação atual e perspectivas de melhoramento futuro para vigilância da Febre Maculosa Brasileira no Estado de São Paulo. O diagnóstico laboratorial da FMB é essencial no serviço de vigilância epidemiológica, pois contribui para o entendimento da doença e auxilia no planejamento das medidas de controle e prevenção da doença. Baseado em métodos de detecção direta, como a PCR, isolamento bacteriano e imunohistoquímica em tecido parafinado e, indireta como a sorologia utilizando a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) A metodologia sorológica pela técnica de RIFI é a mais utilizada, permitindo identificar a soroconversão de anticorpos para FM no soro do paciente em amostras pareadas. O isolamento bacteriano permite a identificação direta do agente infeccioso em culturas celulares porém, fatores que comprometem a viabilidade das riquetsias na amostra clínica podem gerar resultados falso negativos. A PCR identifica o agente etiológico a partir da amplificação de regiões do DNA riquetsial encontrado no soro de pacientes. A imunohistoquímica detecta antígenos riquetsiais nos endotélios vasculares em cortes histológicos de tecidos parafinados. A concentração da bactéria no material biológico analisado impacta na sensibilidade dos métodos de detecção direta, por isso, os melhores desempenhos são observados para casos graves ou fatais e o resultado negativo não deve excluir a suspeita da doença. Mesmo com as metodologias disponíveis para o diagnóstico da FMB, ainda não é possível detectar a doença em estágios iniciais. Portanto, é necessário o aprimoramento contínuo das estratégias diagnósticas, bem como o fortalecimento do sistema de vigilância epidemiológica visando a diminuição da letalidade pelo agravo.

Palavras-chave: Febre Maculosa, imunofluorescência indireta, PCR, *Rickettsia rickettsii*.

ABSTRACT

In Brazil, Brazilian Macular Fever (FMB) was described in 1929. It is an acute febrile infectious disease of a zoonotic nature, transmitted by ticks of the genus *Amblyoma* and caused by the bacterium *Rickettsia rickettsii*. In this work a bibliographic review on the laboratory diagnosis of FMB was carried out, presenting the current situation and prospects for future improvement for surveillance of Brazilian Macular Fever in the State of São Paulo. The laboratory diagnosis of FMB is essential in the epidemiological surveillance service, since it contributes to the understanding of the disease and helps in the planning of disease control and prevention measures. Based on methods of direct detection, such as PCR, bacterial isolation and immunohistochemistry in paraffin waxed tissue and, indirectly as the serology using the Indirect Immunofluorescence Reaction (IFR). The serological methodology by the IFR technique is the most used, allowing the identification of seroconversion of antibodies to the patient's serum in paired samples. The bacterial isolation allows direct identification of the infectious agent in cell cultures, however, factors that compromise the viability of the rickettsias in the clinical sample can generate false negative results. PCR identifies the etiologic agent from the amplification of regions of the rickettsial DNA found in the serum of patients. Immunohistochemistry detects rickettsial antigens in vascular endothelia in histological sections of paraffin tissues. The concentration of the bacteria in the biological material analyzed affects the sensitivity of the direct detection methods, therefore, the best performances are observed for severe or fatal cases and the negative result should not exclude the suspicion of the disease. Even with the methodologies available for the diagnosis of FMB, it is still not possible to detect the disease in the initial stages. Therefore, it is necessary to continuously improve the diagnostic strategies, as well as the strengthening of the epidemiological surveillance system aiming to reduce lethality by the disease.

Keywords: Spotted Fever, Fluorescent Antibody Technique Indirect, PCR, *Rickettsia rickettsia*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais Vetores da Febre Maculosa Brasileira.	12
Figura 2. Mapa dos Casos Confirmados autóctones de FMB no Estado de São Paulo segundo o GVE de residência, no Período de 2007 a 2018.	15
Figura 3. Reação de Imunofluorescência Indireta para Riquetsias do Grupo Febre Maculosa.....	19
Figura 4. Amostra Positiva para Riquetsias do GFM através da técnica de Imunofluorescência Indireta.	19
Figura 5. Perfil linear da absorvância emitida durante os ciclos no protocolo de PCR em tempo real para o gene alvo <i>gltA</i> , utilizando probe do tipo TaqMan® para diagnóstico laboratorial da FMB.....	20
Figura 6. Isolamento em cultura celular (Vero) seguido por identificação por imunofluorescência indireta para riquetsias do Grupo Febre Maculosa (GFM).....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Casos confirmados autóctones de FMB no Estado de São Paulo no período de 2007 a 2018 por GVE de residência.	14
---	----

LISTA DE SIGLAS

BEPA – Boletim Epidemiológico Paulista Anual

CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica

DECS - Descritores em Ciências da Saúde

FM – Febre Maculosa

FMB – Febre Maculosa Brasileira

GFM – Grupo Febre Maculosa

gltA – Gene Citrate Synthase

GT – Grupo Tifo

GVE – Grupo de Vigilância Epidemiológica

IAL – Instituto Adolfo Lutz

IGG – Imunoglobulina G

IGM – Imunoglobulina M

LILACS - Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde

LR – Laboratório de Riquetsia

ompA - Gene Outer Membrane Protein A

PCR - Polymerase Chain Reaction

PUBMED - National Library of Medicine

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

SCIELO - Scientific Eletronic Library Online

TE – Tifo Exantemático

SUMÁRIO

1. Introdução	11
2. Objetivo	16
3. Material e Métodos.....	17
4. Resultados do Levantamento Bibliográfico	18
4.1. Diagnóstico da FMB.....	18
4.1.1. Métodos Indiretos.....	18
4.1.2. Métodos Diretos.....	19
5. Discussão e Conclusões.....	23
5.1. Análise crítica da situação atual do diagnóstico laboratorial	23
5.2. Perspectivas de melhoramentos futuros	24
6. Referências Bibliográficas.....	26

1. Introdução

A Febre Maculosa Brasileira (FMB) é considerada uma zoonose reemergente, de notificação compulsória de grande relevância à saúde pública devido à alta letalidade em humanos (BRASIL, 2017). É uma doença infecciosa febril aguda, causada por riquetsias, bactérias intracelulares obrigatórias, que apresentam tropismo por células endoteliais, e são transmitidas por carrapato (MEIRA *et al.*, 2013).

A FMB foi descrita em 1929, porém teve seu primeiro registro no Estado de São Paulo, em 1900 pelo Dr. Adolpho Lutz, no Instituto Bacteriológico de São Paulo. Inicialmente foi tratada como Tifo Exantemático (TE), mas entre os anos de 1929 e 1931, três pesquisadores demonstraram que a doença tratada como TE era outro tipo de riquetsiose, e passou a ser chamada de Tifo Exantemático de São Paulo. Em 1937, a doença foi denominada de Febre Maculosa Brasileira (PINTER *et al.*, 2016).

O agente etiológico da FMB é uma bactéria pertencente à ordem Rickettsiales, da família Rickettsiaceae e do gênero *Rickettsia*. O gênero a qual pertence possui mais de 20 espécies do Grupo da Febre Maculosa (GFM), sendo a espécie *Rickettsia rickettsii* o agente causador da doença em questão. A bactéria é classificada como alfa-proteobactéria e morfologicamente considerada como cocobacilo gram negativo pleomórfico, desprovido de motilidade. (ANGERAMI *et al.*, 2015)

A transmissão da FMB se dá pela picada do carrapato infectado, principalmente pelas espécies *Amblyomma sculptum* e *Amblyomma aureolatum* (Figura 1) (OLIVEIRA *et al.*, 2016; SZABÓ *et al.*, 2013). Por ser estritamente hematófago, o carrapato infectado transmite a bactéria durante o processo de alimentação (MEIRA *et al.*, 2013). De acordo com os manuais de vigilância, para que a transmissão ocorra estima-se que carrapato esteja aderido ao hospedeiro por um período de 4 a 6 horas (BRASIL, 2016; VIEIRA *et al.*, 2004). Porém, Labruna *et al.* (2014) mostraram que, experimentalmente, em modelo animal de cobaias, a transmissão da *Rickettsia rickettsii* pelo *A. aureolatum* infectado pode ocorrer a partir de 10 minutos de repasto.

A doença possui gravidade variável apresentando desde formas leves e atípicas até formas graves com elevada taxa de letalidade. O período de incubação da doença até manifestação dos primeiros sintomas, varia de 2 a 14 dias (BRASIL, 2017). As manifestações clínicas da doença tem início abrupto e os sintomas iniciais são inespecíficos, como febre alta, cefaleia, mialgia intensa, mal-estar generalizado, náuseas e vômitos (BRASIL, 2017). Entre o segundo e o sexto dia da doença surge o

exantema máculo-papular, predominantemente nos membros inferiores, sendo este um sinal clínico característico importante da doença, porém o exantema pode estar ausente em alguns casos, dificultando o diagnóstico clínico e o tratamento precoce (BRASIL, 2017; PINTER *et al.*, 2016; FIOLE *et al.*, 2010).

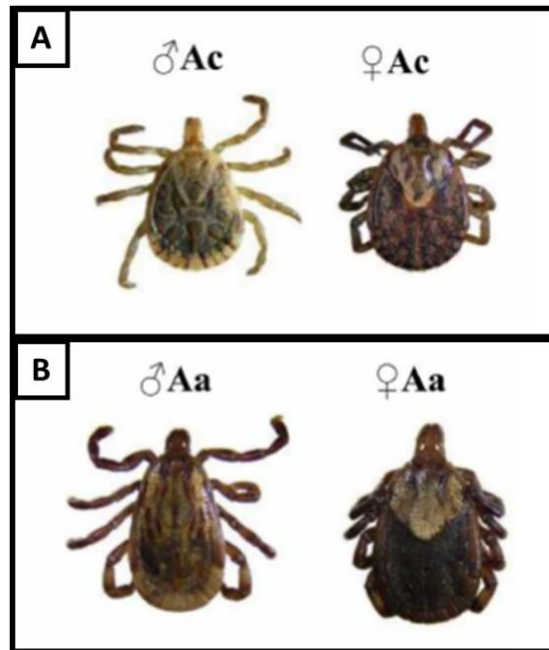


Figura 1. Principais Vetores da Febre Maculosa Brasileira. A) Macho e Fêmea da espécie *Amblyomma sculptum* (anteriormente identificado como vetor incriminado *A. cajennense*); **B)** Macho e Fêmea da espécie *Amblyomma aureolatum*. Fonte: Szabó *et al.*, 2013.

Em casos graves, o exantema se transforma em petequial e depois evolui para hemorrágico, composto por equimoses ou sufusões. Em paciente não tratado, as equimoses podem confluir, podendo evoluir para necrose, principalmente em extremidades (BRASIL, 2017; PINTER *et al.*, 2016; ANGERAMI *et al.*, 2011). Por ser uma doença de nível sistêmico, a bactéria causadora da FM pode acometer diversos sistemas conforme a evolução do quadro, podendo atingir o cérebro, pulmões, coração, fígado, baço, pâncreas e tubo digestivo, levando a maiores complicações e até mesmo a morte (BRASIL, 2017; PINTER *et al.*, 2016). Devido a evolução rápida e inespecífica em estágios iniciais a FMB apresenta altas taxas de letalidade.

No Brasil, a transmissão da FM foi observada em 12 estados do país, principalmente na região Sudeste, onde o Estado de São Paulo apresenta o maior número de casos graves do país (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Segundo o Boletim Epidemiológico Paulista (2011), no Estado, a transmissão do agente etiológico para seres humanos foi intensamente reportada nas décadas 30, 40 e 50 do século XX, ocorrendo em áreas do município de São Paulo que passavam por processo de urbanização, expandindo-se para áreas periféricas da cidade, as quais atualmente compõem a região metropolitana de São Paulo, como Mogi das Cruzes, Diadema e Santo André (LEITE, 2017;PINTER *et al.*, 2016). Durante as décadas de 1940 a 1970 houve o que chamam de silêncio epidemiológico, aparentemente durante este período não foram reportados casos de FMB. No início de 1980, novos casos começaram a reemergir na região do Município de Campinas (LEITE, 2018; PINTER *et al.*, 2016).

De acordo com os dados obtidos no site do Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, no período de 2007 a 2018, 768 casos foram confirmados (Tabela 1), sendo as regiões de Piracicaba e Campinas, com as maiores porcentagens de casos do Estado (Figura 2). As regiões são endêmicas desde 1985, e, apresentam grande importância e atenção da rede de vigilância do Estado (PINTER *et al.*, 2011).

Os dados epidemiológicos da FM nos últimos anos demonstram que as principais regiões endêmicas se mantem ativas para transmissão da doença, sendo influenciadas pela sazonalidade dos vetores e comportamento de reservatórios, bem como exposições humanas a áreas de risco associadas a ocupação ou lazer (PINTER *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2013; PINTER *et al.*, 2011).

O diagnóstico laboratorial da FMB é uma peça fundamental para o serviço de vigilância epidemiológica, pois contribui tanto para o melhor entendimento da doença quanto para o planejamento das medidas de controle e prevenção da FMB.

GVE DE RESIDÊNCIA	Nº DE CASOS	PORCENTAGEM DE CASOS
FRANCO DA ROCHA	1	0,1
ARARAQUARA	1	0,1
PRESIDENTE VENCESLAU	1	0,1
JALES	1	0,1
BARRETOS	2	0,3
BAURU	2	0,3
SANTOS	2	0,3
MOGI DAS CRUZES	3	0,4
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	3	0,4
TAUBATÉ	3	0,4
MARÍLIA	5	0,7
RIBEIRÃO PRETO	5	0,7
OSASCO	7	0,9
PRESIDENTE PRUDENTE	7	0,9
REGISTRO	8	1
BOTUCATU	10	1,3
SÃO JOSÉ DOS CAMPOS	13	1,7
SÃO JOÃO DA BOA VISTA	14	1,8
CARAGUATATUBA	15	2
CAPITAL	35	4,6
SOROCABA	37	4,8
ASSIS	45	5,9
SANTO ANDRÉ	66	8,6
PIRACICABA	130	16,9
CAMPINAS	352	45,8
TOTAL	768	100

Tabela 1. Casos confirmados autóctones de FMB no Estado de São Paulo no período de 2007 a 2018 por GVE de residência. Fonte SINAN-NET, *dados provisórios até 14/12/18.

*Tabela extraída do site do CVE, disponível em http://www.saude.sp.gov.br/recursos/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/fmaculosa/fmb_cautoctone_gve_res.pdf

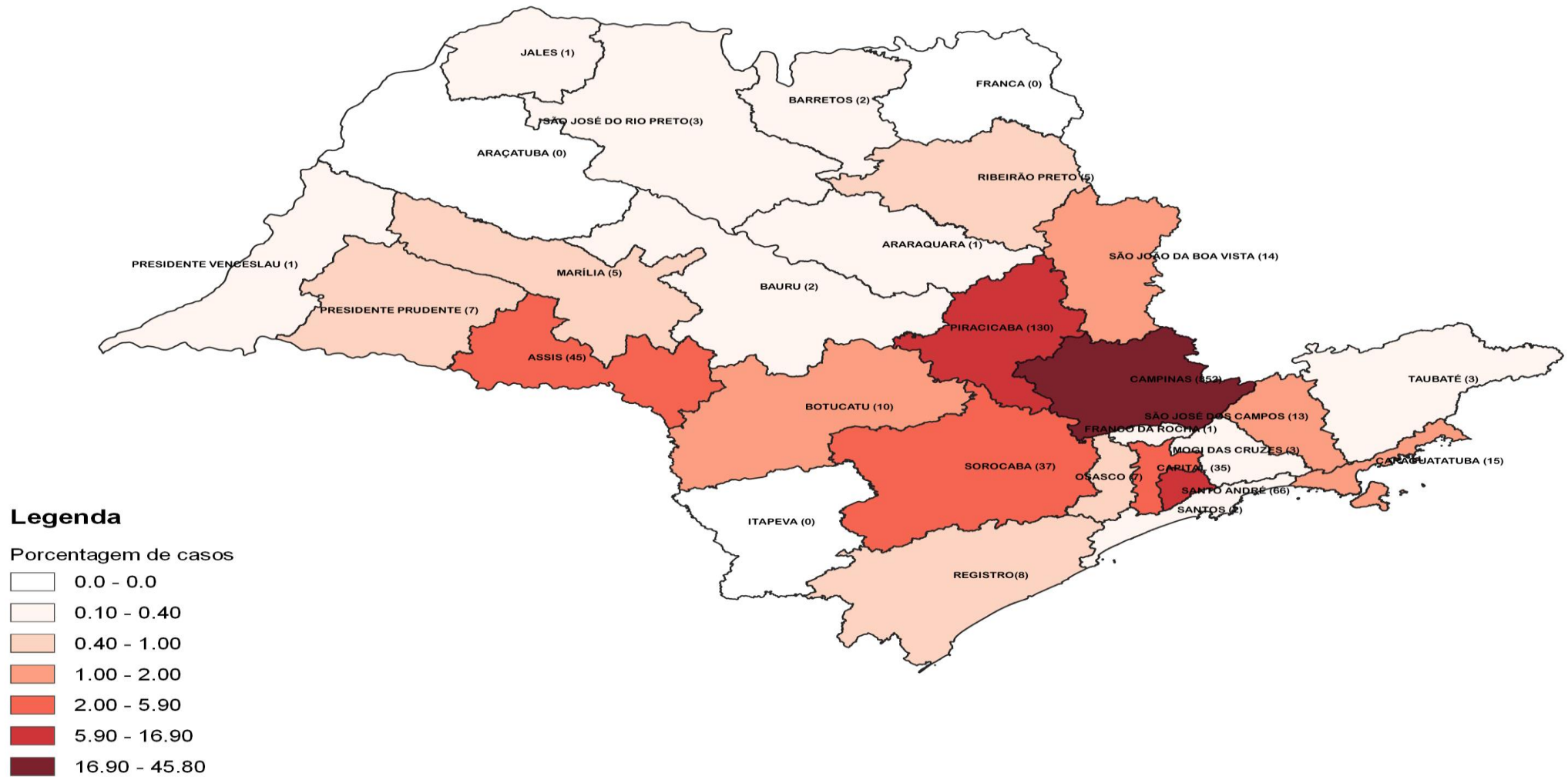


Figura 3. Mapa dos Casos Confirmados autóctones de FMB no Estado de São Paulo segundo o GVE de residência, no Período de 2007 a 2018.

*Fonte: Próprio autor. Elaborado a partir de dados provisórios (até 14/12/2018) obtidos no site do CVE, disponível em http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/fmaculosa/fmb_cautoctone_gve_res.pdf

2. Objetivo

Realizar levantamento bibliográfico sobre o diagnóstico laboratorial da Febre Maculosa Brasileira no Estado de São Paulo, fazendo uma avaliação crítica sobre a situação atual e perspectivas de melhoramento futuro.

3. Material e Métodos

O trabalho constitui de uma revisão bibliográfica sobre o diagnóstico laboratorial da Febre Maculosa no Estado de São Paulo. Para a pesquisa utilizou-se como referencial teórico, as principais bases de dados Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), Scientific Eletronic Library Online (SCIELO) e National Library of Medicine (PUBMED). As buscas foram realizadas através dos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) presentes na base de dados BVS: Febre Maculosa, *Rickettsia rickettsii*, imunofluorência indireta, PCR. Neste estudo foram utilizados artigos publicados na língua inglesa e portuguesa, documentos e manuais disponibilizados pelo Ministério da Saúde, Teses e Dissertações, utilizando como critérios de seleção os trabalhos a partir do ano de 2003, e incluindo trabalhos que abordassem assuntos sobre FM e relacionados ao diagnóstico laboratorial da doença.

Também foram utilizados dados estatísticos extraídos do site do Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (CVE) no período de 2007 a 2018, para elaboração de um mapa com a distribuição dos casos confirmados pelo Estado segundo o GVE de residência. O mapa foi elaborado utilizando o programa Quantum Gis 3.2.

4. Resultados do Levantamento Bibliográfico

4.1. Diagnóstico da FMB

4.1.1. Métodos Indiretos

Dentre os mais utilizado para diagnóstico da FMB, o método sorológico, é considerado padrão ouro. A técnica para detecção de anticorpos específica mais utilizada para FMB é a Reação de Imunofluorescência Indireta (Figuras 3 e 4), onde o diagnóstico confirmatório se dá pelo aparecimento de anticorpos específicos, que aumentam em título com a evolução da doença, em amostras pareadas do paciente. A primeira amostra de soro deve ser colhida nos primeiros dias da doença (fase aguda) e a segunda amostra de 14 a 21 dias (fase de convalescença) após a primeira coleta. Segundo recomendações do Ministério da Saúde, as amostras devem ser processadas de forma pareada, realizadas sob as mesmas condições e analisadas pelo mesmo operador (BRASIL, 2017; PINTER et al., 2016).

A confirmação diagnóstica pela sorologia é dada pela presença de um aumento de no mínimo quatro vezes nos títulos de anticorpos em amostras pareadas de soro (BRASIL, 2017; PINTER et al., 2016). Geralmente a detecção de anticorpos específicos para FMB só é possível a partir de 7 a 10 dias após o aparecimento dos primeiros sintomas da doença, portanto, na maioria dos casos, a amostra colhida na fase aguda apresenta-se negativa, indicando que não houve contato prévio com o agente etiológico da FMB. A detecção de anticorpos IgM específicos para FMB por RIFI não são usualmente utilizados como marcadores de fase aguda devido à ocorrência de reações inespecíficas que podem resultar em reatividade cruzada com outras doenças como dengue, leptospirose, favorecendo o resultado falso positivo. Já os anticorpos específicos da classe IgG aparecem pouco tempo depois dos IgM, e sendo aplicados em amostras pareadas são mais específicos, portanto mais indicados para diagnóstico sorológico (BRASIL, 2017; PINTER et al., 2016; PAROLA et al., 2005).

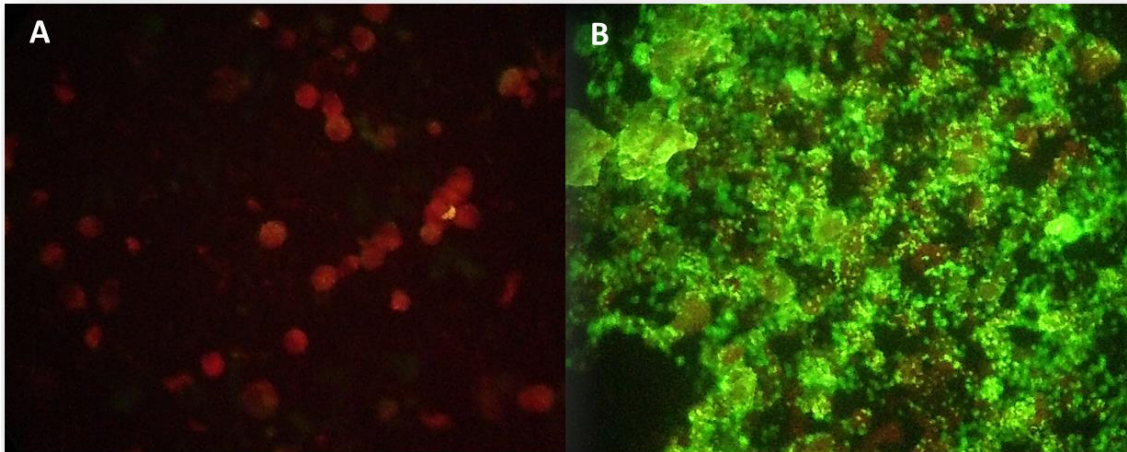


Figura 4. Reação de Imunofluorescência Indireta para Riquetsias do Grupo Febre Maculosa. A) Controle Negativo (40x); B) Controle Positivo (40x); Fonte: Arquivo Pessoal.

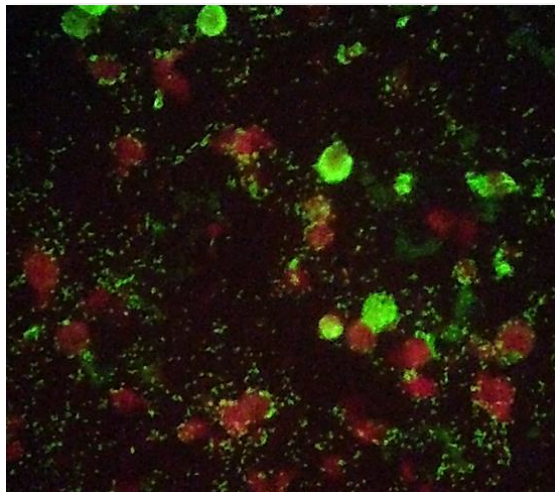


Figura 5. Amostra Positiva para Riquetsias do GFM através da técnica de Imunofluorescência Indireta. Amostra diluída em 1:64 (40x). Fonte: Arquivo Pessoal

4.1.2. Métodos Diretos

A imuno-histoquímica é um método que pode ser utilizado para detecção de antígenos de riquetsiais presentes em células endoteliais de amostras de tecido em cortes histológico, sendo, portanto um método direto para detecção de FMB. Nesta técnica, muito utilizada em amostras de autopsias, as amostras de tecido são fixadas

em formalina 10% e incluídas em parafina. Os cortes histológicos são processados para imuno-histoquímica, onde anticorpos policlonais anti-*Rickettsia rickettsii* são utilizados como marcadores específicos (PINTER et al, 2016; BRASIL, 2017; SANTOS, 2014). No resultado positivo é possível observar a presença de antígenos de riquetsia do Grupo da FMB nas regiões do tecido correspondentes ao endotélio do vasos sanguíneos. As amostras de tecidos podem ser obtidas através de biópsia de lesões de pele de pacientes em fases iniciais da doença, pacientes graves, ou em material de necrópsia, como fragmentos de pulmão, fígado, baço, coração, músculos e cérebro. A imuno-histoquímica para FMB é considerada o método sensível, comparável à PCR em amostras de sangue periférico, porém, ambas as técnicas são afetadas pelo tempo de utilização da antibioticoterapia específica que antecedeu a coleta da amostra biológica para o exame. (PINTER et al, 2016; BRASIL, 2016).

Outro método direto utilizado para o diagnóstico da FMB é a Polymerase Chain Reaction (PCR), uma técnica de biologia molecular que se baseia na detecção da replicação de DNA riquetsial extraído de amostras clínicas, preferencialmente soro humano. Geralmente são utilizadas 2 regiões gênicas específicas, sendo a *gltA* (citrato sintase), presente em todas as espécies do gênero *Rickettsia* (SANTOS, 2014; PINTER et al, 2011) e a *OmpA*, proteína de superfície que identifica o Grupo Febre Maculosa, as mais utilizadas para a rotina diagnóstica. No Instituto Adolfo Lutz, Laboratório de Referência Regional para Riquetsioses, utiliza-se a técnica de PCR em Tempo Real (Figura 5), somente para casos graves ou óbitos, quando, devido à vasculite intensa, é possível detectar o agente em amostras de sangue periférico.

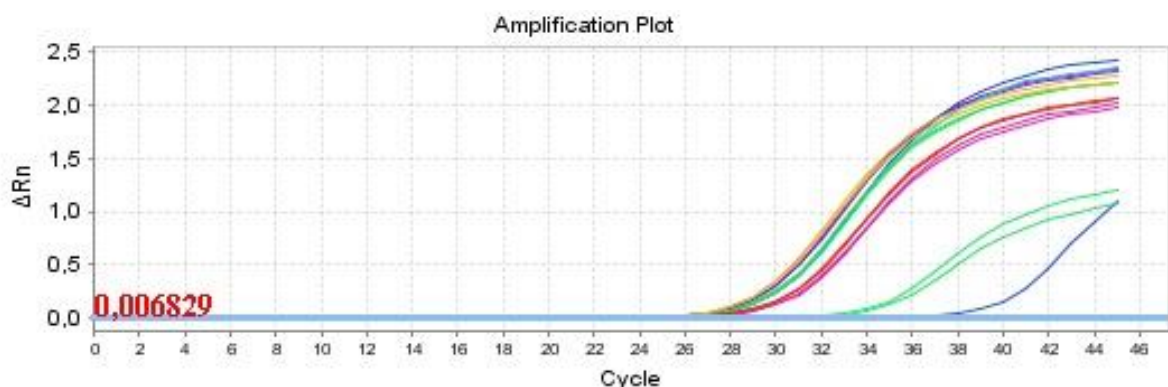


Figura 6. Perfil linear da absorvância emitida durante os ciclos no protocolo de PCR em tempo real para o gene alvo *gltA*, utilizando probe do tipo TaqMan® para diagnóstico laboratorial da FMB. Equipamento utilizado: ABI7500. Registro de resultado de experimento interpretado pelo software ABI7500. Fonte: Imagem cedida pelo Laboratório de Riquetsia do IAL.

O resultado positivo na PCR, em geral, confirma a suspeita de FMB, porém o resultado negativo não descarta a hipótese diagnóstica, uma vez que podem ocorrer interferentes relacionados possíveis substâncias inibidoras da reação, como alguns medicamentos, ou ainda a baixa bacteremia no período de coleta da amostra biológica. (PINTER *et al.*, 2016; SANTOS, 2014; PINTER *et al.*, 2011).

O isolamento em cultura é um método diagnóstico específico para a identificação do agente etiológico. Os materiais biológicos que apresentam melhor crescimento de riquetsias *in vitro* são amostras de fragmentos de lesão cutânea e/ou coágulos sanguíneos (PINTER *et al.*, 2016; ; PINTER *et al.*, 2011; NASCIMENTO, 2010), os quais devem ser colhidos em condições de assepsia, armazenado em frascos estéreis contendo o meio de transporte e conservação de riquetsias BHI e armazenados e transportados ao laboratório à temperatura mínima de -70°C . Por serem bactérias intracelulares obrigatórias, as riquetsias necessitam de culturas celulares suscetíveis para o seu crescimento *in vitro*, sendo geralmente utilizadas células *Vero* (Figura 6). A manipulação do agente etiológico viável é um procedimento que apresenta alto risco individual para o manipulador, portanto, é realizado sob condições de biossegurança NB3 (PINTER *et al.*, 2016; PINTER *et al.*, 2011; NASCIMENTO, 2010).

O isolamento é indicado para casos graves ou fatais, uma vez que as concentrações da bactéria na amostra biológica podem influenciar na sensibilidade do exame. Outro fator que influencia no resultado final é a qualidade da amostra, ou seja, as condições de coleta, armazenamento e transporte da amostra impactam na viabilidade das riquetsias na amostra clínica, bem como possíveis contaminações por outros micro-organismos (PINTER *et al.*, 2016; PINTER *et al.*, 2011).

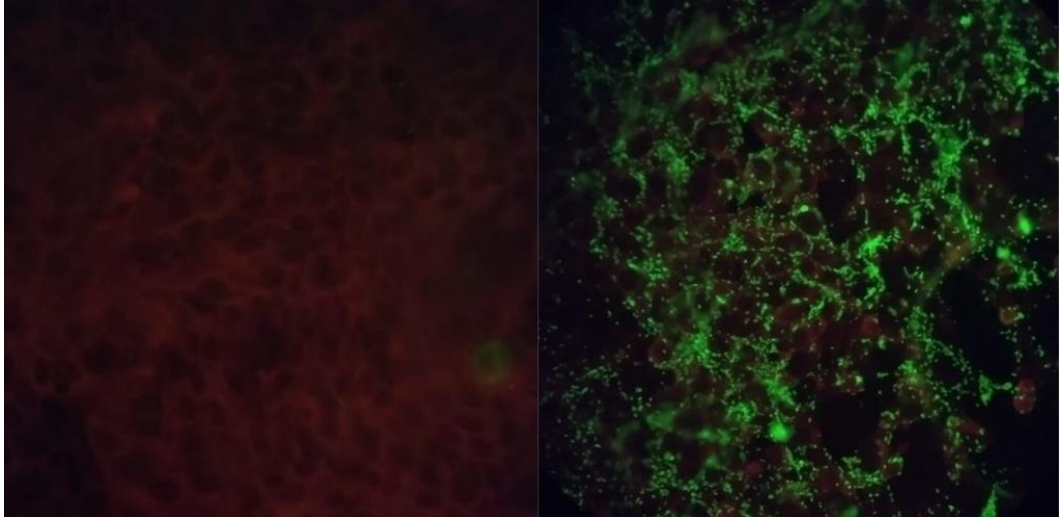


Figura 7. Isolamento em cultura celular (Vero) seguido por identificação por imunofluorescência indireta para riquetsias do Grupo Febre Maculosa (GFM). Controle negativo (à esquerda) e amostra positiva (à direita) (40x). Fonte: Arquivo pessoal

5. Discussão e Conclusões

5.1. Análise crítica da situação atual do diagnóstico laboratorial

Devido à alta letalidade, a FMB, é vista como um problema de saúde pública, de ocorrência em focos naturais em algumas regiões, onde constantemente casos esporádicos são notificados e pequenos surtos epidêmicos relatados (BARROS-SILVA *et al.*, 2014; KATZ, *et al.* 2009; HORTA, 2004).

A precocidade do diagnóstico da FMB é imprescindível para que o tratamento ocorra antes que o quadro evolua de forma irreversível (LEITE, 2017). Porém o diagnóstico precoce da FMB é um grande desafio para os profissionais da área da saúde, pois se trata de uma doença de baixa incidência, na qual o início dos sintomas podem se confundir com outras febres hemorrágicas mais frequentes, como por exemplo, a dengue.

Diante deste cenário o diagnóstico da FMB deve ser baseado inicialmente nas informações clínicas e epidemiológicas associadas ao caso suspeito, sendo o diagnóstico laboratorial importante para validar retrospectivamente a precisão do diagnóstico clínico, além de auxiliar no entendimento da epidemiologia e impacto na saúde pública, bem como nortear as ações da vigilância epidemiológica (ANGERAMI, 2011).

Em São Paulo, o diagnóstico laboratorial da FMB é realizado pelo Instituto Adolfo Lutz, que também responde como Laboratório de Referência para outros Estados como Paraná, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul.

No Instituto Adolfo, no Laboratório de Riquetsias, são realizados exames de sorologia para FMB pela técnica de RIFI, isolamento de riquetsias do Grupo FM, e a PCR em tempo real aplicados aos casos graves e fatais; no Centro de Patologia são realizados exames de histopatologia e imunohistoquímica para FMB.

A RIFI é uma metodologia diagnóstica sensível para FMB, sendo extensivamente utilizada pelo laboratório de saúde pública (BRASIL, 2017), porém detectam anticorpos específicos para o Grupo Febre Maculosos sem permitir a identificação em nível de espécie incriminada (NASCIMENTO, 2010).

A RIFI é um método simples, de baixo custo e possui alta sensibilidade para identificar a presença de anticorpos no soro (sensibilidade entre 84 a 100%). Porém deve ser considerado o período de janela imunológica, pois durante este período os títulos de anticorpos ainda não atingiram concentrações detectáveis pela RIFI. Estima-se que período pode variar entre o dia da picada do carrapato infectado até 7-10 dias

após o surgimento dos primeiros sintomas. O diagnóstico laboratorial sorológico, sendo realizado de forma pareada e objetivando a identificação da soroconversão, possibilita a identificação de cicatrizes sorológicas, causadas por contatos anteriores ao sintoma clínico investigado, situação que pode ser encontrada em regiões endêmicas da doença, sem induzir a um resultado falso positivo.

Na técnica de isolamento bacteriano em cultura de células *Vero*, também pode ser utilizada a RIFI para identificação indireta do crescimento bacteriano. Essa técnica é útil em casos mais graves e de óbitos, pois há intensa riquetsemia, e conseqüentemente, as possibilidades de isolamento de riquetsia são maiores (QUESADA et al.,2006). Além da identificação do agente para o diagnóstico, o isolamento de riquetsias em cultura celular possibilita estudos posteriores de caracterização molecular dos isolados e produção de antígeno para RIFI (SANTOS, 2014). Apesar da técnica ser útil no diagnóstico, o resultado negativo é inconclusivo, pois uma série de fatores pode interferir em seu resultado, como o uso de antibiótico antes da coleta, as condições de coleta, armazenamento e transporte da amostra.

No Instituto Adolfo Lutz os métodos moleculares para o diagnóstico da FM em humanos foram implantados na rotina em 2011, sendo indicados para casos graves ou fatais. Santos, (2014) demonstrou que PCR em tempo real para FMB apresenta baixa sensibilidade para detectar casos não fatais em amostras de soro, devido à baixa bacteremia. Após implantação da PCR em Tempo Real na rotina diagnóstica para febre maculosa, observou-se um aumento ao longo dos anos no número de óbitos confirmados para a doença (LEITE, 2017; SANTOS, 2014), porém, deve-se considerar sua limitação exclusiva para casos graves ou fatais, onde há bacteremia suficiente para ser detectada em amostra de sangue. Resultados negativos oriundo de casos graves não fatais devem necessariamente ser confirmados pela sorologia em amostras pareadas para evitar resultados falso-negativos.

5.2. Perspectivas de melhoramentos futuros

Mesmo com o avanço da incorporação da PCR em tempo real na rotina diagnóstica, a vigilância laboratorial da FMB ainda é incapaz de detectar a doença em estágios iniciais, sendo necessário continuo aprimoramento das técnicas em busca de diagnósticos confirmatórios cada vez mais precoces, com a finalidade de evitar a letalidade pelo agravo.

Outras medidas que podem causar um impacto para prevenção da letalidade pela FMB são:

Treinamento contínuo dos profissionais de saúde visando melhorar a identificação e manejo do paciente com suspeita da doença, uma vez que pode ser facilmente confundida com várias outras: meningococemia, rubéola, leptospirose, infecção por enterovírus, febre tifóide e outros quadros purpúricos (BRASIL, 2017).

Um serviço de vigilância epidemiológica ativo e integrado com o serviço de assistencial de saúde, laboratório e vigilância ambiental visando promover a diminuição da letalidade.

Intensificação das medidas de controle e prevenção da FMB no período de maior sazonalidade da doença.

Programas governamentais para disponibilização estratégica de antibióticos específicos, e em formas farmacêuticas apropriadas, nas principais regiões endêmicas, é uma política pública que poderia impactar na letalidade pelo agravo (ANGERAMI, 2011).

6. Referências Bibliográficas

ANGERAMI, Rodrigo Nogueira et al. **Febre maculosa brasileira no estado de São Paulo: aspectos clínicos e epidemiológicos**. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas 2011.

ANGERAMI, R. N. et al. Febre Maculosa Brasileira e Outras Riquetsioses no Brasil, p.899-923. In: FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 5. ed. rev. e atual. Editora Atheneu, São Paulo, 2015. 1488 f.

BARROS-SILVA, Priscilla Martins Rafael et al. Febre maculosa: uma análise epidemiológica dos registros do sistema de vigilância do Brasil. **Scientia Plena**, v. 10, n. 4 (A), 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Febre maculosa brasileira e outras riquetsioses. **Guia de vigilância em saúde: volume único**, p. 445-455, 2017. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/14/GVS-febre-maculosa-2017.pdf>

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 204, de 17 de fevereiro de 2016. Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 23-23, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde Fundação Nacional de Saúde (2002). Portaria n 210, de 12 de setembro de 2002. Divulga relação de Órgãos/Entidades que possuem laboratórios pré-selecionados para integrar a Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Epidemiológica. Diário Oficial da União. Brasília, 12 de setembro de 2002.

VIEIRA, A. M. L. et al. Manual de vigilância acarológica, Estado de São Paulo. **São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde**, 2004.

DE OLIVEIRA, Stefan Vilges et al. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 22, n. 1, p. 22, 2016.

FIOL, Fernando de Sá Del et al. A febre maculosa no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 27, p. 461-466, 2010.

HORTA, Maurício C. et al. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Sao Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group *Rickettsia*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 71, n. 1, p. 93-97, 2004.

LEITE, R.M. A Febre maculosa brasileira. . **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online)**, 167-168, 217-221, 2017.

KATZ, Gizelda et al. Situação epidemiológica e importância da febre maculosa no Estado de São Paulo. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online)**, v. 6, n. 69, p. 4-13, 2009.

MEIRA, Ana Maria de et al. Febre maculosa: dinâmica da doença, hospedeiros e vetores. In: **Febre maculosa: dinâmica da doença, hospedeiros e vetores**. 2013.

MONTEIRO, Kerla Joeline Lima; ROZENTHAL, Tatiana; LEMOS, Elba Regina Sampaio de. Diagnóstico diferencial entre a febre maculosa brasileira e o dengue no contexto das doenças febris agudas. **Rev Patol Trop.**, v.43, n.3, p. 241-250, jul.-set. 2014.

NASCIMENTO, Elvira Maria Mendes do; SILVA, Luiz Jacintho da. Febre maculosa brasileira: avaliação comparativa das metodologias de imunofluorescência indireta (IFI) e reação em cadeia pela polimerase (PCR) em amostras de pacientes provenientes de áreas endêmicas do Estado de São Paulo. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online)**, v. 7, n. 83, p. 29-29, 2010.

NASCIMENTO, Elvira Maria Mendes do. **Isolamento e detecção molecular de riquetsias do Grupo Febre Maculosa, a partir de Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) e espécimens biológicos humanos, provenientes de áreas endêmicas do Estado de São Paulo.** (Dissertação). Instituto de Ciências Biomédicas Universidade de São Paulo 2003.

OLIVEIRA, Stefan Vilges de et al. Vigilância de ambientes da febre maculosa brasileira e outras riquetsioses: a etapa inicial de uma proposta para a formação de rede. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 3, p. 67-71, 2015.

PINTER, Adriano et al. Febre Maculosa Brasileira. **Bepa-Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 8, n. supl. 1, p. 1-32, 2011.

PINTER, A. et al. A Febre maculosa brasileira na região Metropolitana de São Paulo. **Bol. Epidemiol. Paulista**, v. 13, p. 1-45, 2016.

QUESADA, Mariela et al. Ten Years' Experience of Isolation of Rickettsia spp. from Blood Samples Using the Shell-Vial Cell Culture Assay. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, n. 1, p. 578-581, 2006.

RIBEIRO, Mateus Duarte et al. Fatores ambientais envolvidos na epidemiologia da febre maculosa no estado de São Paulo. **Hygeia**, v. 9, n. 16, p. 103-114, 2013.

SANTOS, Fabiana Cristina Pereira dos. **Aplicações da PCR em tempo real no diagnóstico laboratorial da Febre Maculosa Brasileira.** Tese de Doutorado. Centro de Controle de Doenças/SES 2014.

SZABÓ, Matias Pablo Juan; PINTER, Adriano; LABRUNA, Marcelo Bahia. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, p. 27, 2013.