

ELVIRA MARIA MENDES DO NASCIMENTO

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

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Luiz Jacintho da Silva

**SÃO PAULO
2010**

DEDICATÓRIA

***Ao meu marido José Antonio
Aos meus filhos Thais e Jimmy***

AGRADECIMENTOS

Foram várias as pessoas que compartilharam desta parte da história da minha vida e que em diferentes momentos e de diversas formas, apoiaram, incentivaram, ajudaram, torceram, ajudando-me a chegar ao fim sem desistir.

A todos, muito obrigado!

Agradeço ao **Dr Luiz Jacintho da Silva** que, como orientador soube respeitar minhas idéias e tempos, porém sempre acreditando na minha capacidade profissional.

À **Dra Maria do Carmo S T Timenetsky, Diretora do Centro de Virologia** pelo incentivo, apoio e oportunidade para a realização da tese.

À **Dra Luiza Terezinha Mádia de Souza**, sempre amiga incentivando, e apoiando em todos os momentos.

À **Dra Maria de Fátima Costa Pires** pelo apoio incondicional e estímulo para a conclusão da minha tese.

À **Dra Myrna Sabino** pelo apoio e incentivo para a conclusão da tese.

As minhas **amigas do laboratório: Silvia, Eliana, Fabiana e Nilcéia** pelo incentivo, paciência, estímulo e carinho. Um agradecimento especial à **Sílvia e Fabiana** pela precisão e confiabilidade da execução da parte experimental deste projeto.

Ao **Dr Rodrigo Nogueira Angerami, Médico Infectologista da Unicamp**, pela amizade, incentivo e principalmente pelo apoio na parte clínica.

À **Dra Gizelda Katz, Médica Epidemiologista do Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof Alexandre Vranjac”, São Paulo**, pelo apoio na parte epidemiológica.

Ao **Dr Cláudio Santos Ferreira e Dra Maria Esther de Carvalho** pela leitura atenta e recomendações valiosas.

A todos os **colegas do laboratório de Exantemas** agradecimentos pelo carinho, amizade e apoio permanente.

À **Dra Regina Célia Moreira** pela ajuda, apoio e permanente incentivo para a conclusão da tese.

A todos os **Pesquisadores, amigos e colegas do Centro de Virologia** pelo estímulo, carinho e incentivo nestes longos anos de trabalho. O meu profundo agradecimento.

Nascimento, E.M.M. **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, 2010. Tese (Doutorado)** – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

RESUMO

As aplicações da reação em cadeia pela polimerase (*Nested PCR*) foram avaliadas em comparação com a pesquisa de anticorpos e isolamento bacteriano, para o diagnóstico de casos fatais com suspeita de riquetsioses do Grupo da Febre Maculosa (GFM) em amostras de soro. A PCR foi baseada na especificidade dos iniciadores derivados de uma região gênica conservada que codifica um antígeno de 17-kDa (*htrA*). Amostras de soro de 50 casos fatais suspeitos de riquetsioses do GFM foram testadas através da Imunofluorescência Indireta (IFI) para pesquisa de IgG e IgM e *Nested PCR* após extração do DNA com kit específico para extração de soro. O isolamento bacteriano foi realizado quando foram encaminhadas amostras adequadas para o exame. O fragmento específico de riquetsias GFM foi detectado em 40% (20/50) dos soros testados em comparação com 22% (11/50) detectados pelos métodos sorologia e isolamento bacteriano. Os produtos amplificados foram confirmados pela análise do sequenciamento de fragmentos de DNA apresentando 100% de identidade com *R. rickettsii* e com Grupo da Febre Maculosa. Os resultados obtidos indicam que a utilização da *Nested PCR* em amostras de soro aumenta a sensibilidade para o diagnóstico da FM em casos fatais com suspeita clínica da doença, sendo indicada sua aplicação em complemento à sorologia e ao isolamento.

Nascimento, E.M.M. **Brazilian Spotted Fever: Comparative evaluation of Indirect Immunofluorescence assay (IFA) and Polymerase Chain Reaction (PCR) methodology in human serum samples from endemic areas of São Paulo State.**

ABSTRACT

The application of polymerase chain reaction (*Nested* PCR) assay has been evaluated in comparison with antibody research and bacterial isolation for the diagnosis of fatal cases of spotted fever group rickettsiosis in serum samples. PCR was based on specific primers derived from the conserved 17kDa common antigen gene (*htrA*). Serum samples of 50 fatal cases suspected of spotted fever group rickettsiosis infection were tested by antibody IgG and IgM (IFA) and *Nested* PCR after DNA extraction with kit to specific serum DNA extraction. Bacterial isolation was carried out and the suitable samples were sent for diagnosis. The SFG rickettsia-specific DNA fragment was detected in 40%(20/50) of the tested sera, compared to 22% (11/50) serum samples that were positive by serology and bacterial isolation. PCR amplicons were sequenced using DNA fragments and confirmed a 100% identity with *Rickettsia rickettsii* and spotted fever group rickettsiosis. Results obtained indicate that *Nested* PCR assay in serum samples increased spotted fever diagnosis sensibility in the fatal cases with clinical suspicion thus being recommended as a complementary methodology to serology and isolation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Meio de infusão cérebro coração ("Brain Heart Infusion")
BS-C-1	Linhagem celular de rim de macaco verde africano
°C	graus Celsius
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof Alexandre Vranjac"
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay- Ensaio Imunoenzimático
DNA	Deoxyribonucleic Acid - Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Nucleotídeos trifosfatados
FC	Fixação de Complemento
FM	Febre Maculosa
FMB	Febre Maculosa Brasileira
FMM	Febre Maculosa do Mediterrâneo
FMMR	Febre Maculosa das Montanhas Rochosas- EUA
GFM	Grupo da Febre Maculosa
GT	Grupo Tifo
g	Aceleração da gravidade
HAI	Inibição de Hemaglutinação
HeLa	Linhagem celular de carcinoma de útero – Humana
HEp-2	Linhagem celular de carcinoma de laringe – Humana
IFI	Imunofluorescência Indireta
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IgG	Imunoglobulina do tipo G
IgM	Imunoglobulina do tipo M
kDa	Kilodalton
LLC- MK₂	Linhagem celular de rim de macaco Rhesus

L- 929	Linhagem celular de fibroblasto de camundongo
MEM	Meio Mínimo de Eagle
min	Minutos
ml	Mililitro
PBS	Salina em tampão fosfato ("Phosphate-Buffered Saline")
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction – Reação em cadeia pela polimerase
rOmpA	Outer membrane protein A – proteína externa de membrana A
rOmpB	Outer membrane protein B – proteína externa de membrana B
RGFM	Riquetsias do Grupo da Febre Maculosa
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RNA	Ribonucleic Acid - Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
Taq	DNA polimerase termoestável extraída da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
U	Unidades
Vero	Linhagem celular de rim macaco verde africano
WI-38	Linhagem celular de pulmão de feto humano
μl	Microlitro
μg	Micrograma
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
≤	menor ou igual
%	por cento
®	Marca registrada

Obs: Algumas abreviaturas seguem as iniciais de sua grafia no idioma inglês, visto terem seu uso consagrado na literatura técnica.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

	Pag
Tabela 1	Datas históricas das principais doenças causadas por Riquetsias. 4
Tabela 2	<i>Rickettsia spp</i> isoladas de carrapatos no Brasil 7
Figura 1	Exantema petequial da FMB. 14
Figura 2	Alinhamento das sequências de nucleotídeos para o gene riquetsial 17-kDa. 18
Figura 3A	Número total de exames para diagnóstico de FMB realizados no Laboratório de Riquetsias do Instituto Adolfo Lutz no período de 1985-2008. 22
Figura 3B	Número de casos confirmados de FMB realizados no Laboratório de Riquetsias do Instituto Adolfo Lutz no período de 1985-2008. 22
Figura 4A	Distribuição dos casos suspeitos e confirmados de FMB em relação à procedência no ano de 2007. 23
Figura 4B	Distribuição dos casos suspeitos e confirmados de FMB em relação à procedência no ano de 2008. 23
Figura 5A	Distribuição dos casos suspeitos de FMB nos meses do ano 2004 a 2008. 24
Figura 5B	Distribuição dos casos confirmados de FMB nos meses do ano 2004 a 2008. 24
Tabela 3	Oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) utilizados para <i>Nested</i> PCR. 32
Figura 6	Deteção de anticorpos contra riquetsias do Grupo Febre Maculosa (RIFI), utilizado nas amostras de soro de paciente com suspeita clínica da doença. 34
Figura 7	Deteção de riquetsias do Grupo da FMB através do isolamento em cultura de células Vero e identificação por IFI. 35
Figura 8	Análise eletroforética dos produtos amplificados em diluições seriadas do controle positivo (isolado 1413-04) em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio. 36

Figura 9	Análise eletroforética dos produtos amplificados em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio, em A primeiro PCR (Rr17-122 e Rr17-500), em B, segundo PCR (<i>NESTED</i>) – 10 primeiras amostras.	37
Figura 10	Análise eletroforética dos produtos amplificados em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio, em A, primeiro PCR (Rr17-122 e Rr17-500), em B, segundo PCR (<i>NESTED</i>) – 11 ^a a 20 ^a amostras.	38
Figura 11	Análise eletroforética dos produtos amplificados em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio, em A, primeiro PCR (Rr17-122 e Rr17-500), em B, segundo PCR (<i>NESTED</i>) – 21 ^a a 30 ^a amostras.	39
Figura 12	Análise eletroforética dos produtos amplificados em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio, em A, primeiro PCR (Rr17-122 e Rr17-500), em B, segundo PCR (<i>NESTED</i>) – 31 ^a a 40 ^a amostras.	40
Figura 13	Análise eletroforética dos produtos amplificados em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio, em A, primeiro PCR (Rr17-122 e Rr17-500), em B, segundo PCR (<i>NESTED</i>) – 41 ^a a 50 ^a amostras.	41
Figura 14	Análise eletroforética dos produtos amplificados em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio do segundo PCR (<i>NESTED</i>) – repetição de casos sugestivos positivos (4 µL de DNA primeiro PCR/ 6 µL <i>Nested</i>).	42
Figura 15	Análise eletroforética dos produtos amplificados em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio do segundo PCR (<i>NESTED</i>) – repetição de casos sugestivos positivos (6 µL de DNA primeiro PCR/ 4 µL <i>Nested</i>).	43
Figura 16	Porcentagem de casos positivos detectados com diferentes metodologias de diagnóstico para Febre Maculosa.	44
Tabela 4	Comparação entre os resultados obtidos pelos métodos: sorologia (IFI) e a <i>Nested</i> PCR.	45
Tabela 5	Comparação entre os resultados obtidos pelos métodos: isolamento bacteriano em cultura de células e a <i>Nested</i> PCR.	45
Tabela 6	Comparação entre os resultados obtidos pelos métodos atualmente utilizados na rotina: sorologia (IFI) e isolamento bacteriano em cultura de células e a <i>Nested</i> PCR.	46

Índice

	Pag
1. Introdução	01
2. Revisão da Literatura	03
2.1. Histórico da Febre Maculosa	03
2.2. Patógeno	07
2.3. Modo de Transmissão/ Patogênese	08
2.4. Epidemiologia	09
2.5. Manifestações Clínicas	13
2.6. Diagnóstico Laboratorial	15
3. Retrospectiva Laboratorial	19
4. Justificativa	25
5. Objetivos	26
5.1. Objetivo Geral	26
5.2. Objetivos Específicos	26
6. Casuística, Material e Métodos.	27
6.1. Casuística	27
6.1.1. Aspectos Éticos	27
6.2. Material e Métodos	28
6.2.1. Amostras Clínicas	28
6.2.2. Pesquisa de Anticorpos contra FM - RIFI	28
6.2.3. Isolamento para Riquetsias do GFM “Shell vial”	29
6.2.4. Extração do DNA em Amostras de Soro	30

6.2.5. Diagnóstico Molecular – <i>Nested</i> PCR	30
6.2.6. Diagnóstico Molecular- Controle de Qualidade	33
7. Resultados	34
7.1. Pesquisa de Anticorpos contra FM	34
7.2. Isolamento para Riquetsias do GFM	35
7.3. Detecção Específica de Riquetsias GFM – Validação da Reação	36
7.4. Detecção Específica de Riquetsias GFM – Análise das Amostras	37
7.5. Detecção Específica de Riquetsias GFM – Amostras Repetidas	42
7.6. Sequenciamento dos Fragmentos Amplificados	44
7.7.. Análise Comparativa das Metodologias	44
8. Discussão	47
9. Conclusão	51
10. Referência Bibliográfica	52
11. Apêndice	61
11.1. Apêndice 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Instituto Adolfo Lutz.	63
11.2. Apêndice 2 – Dados sobre os pacientes com suspeita de FMB que evoluíram para óbito.	64
11.2. Apêndice 3 – Alinhamento das sequências de nucleotídeos da região do antígeno 17 kDa comum às riquetsias do Grupo da Febre Maculosa.	65
11.3. Apêndice 4 – Trabalhos Publicados	69

1. INTRODUÇÃO:

A Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (FMMR) é uma doença transmitida por carrapatos, potencialmente fatal em humanos e causada pela *Rickettsia rickettsii*, uma bactéria intracelular obrigatória e gram negativa. É endêmica no Canadá, Estados Unidos, México, América Central, Brasil, Colômbia e Argentina (Paddock *et al* 2008; Sexton *et al.* 1993; Walker, 1978). As riquetsioses estão amplamente distribuídas pelo mundo em focos endêmicos, emergindo a intervalos esporádicos e de forma epidêmica na população humana. Estão associadas a diversos artrópodes, que além de vetores, podem atuar como seus reservatórios. Dentre os mamíferos, o homem inclusive entra acidentalmente no ciclo epidemiológico das riquetsias (Magalhães, 1952; Greene, 1987).

No Brasil, temos uma riquetsiose similar à Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (FMMR), causada por riquetsias do Grupo Febre Maculosa (RGFM) e transmitida ao homem por carrapatos do gênero *Amblyomma*, principalmente *Amblyomma cajennense* (Dias *et al.* 1939). Constitui um problema de saúde pública, ocorrendo em focos naturais em diversos países do mundo, onde notificações de casos esporádicos e pequenos surtos epidêmicos são continuamente relatados (Fishbein *et al.*, 1984).

Tipicamente o quadro clínico da Febre Maculosa Brasileira (FMB) inclui febre alta, mialgia, cefaléia, artralgia, já o exantema típico pode ser observados em aproximadamente 30% dos pacientes. A doença, porém pode evoluir rapidamente com extrema gravidade comprometendo o funcionamento de órgãos vitais e levando ao óbito em poucos dias. A maioria dos óbitos associados à FMB ocorre dentro de 10 dias a partir do aparecimento dos primeiros sintomas, quando os anticorpos específicos no soro ainda não são detectáveis.

Os anticorpos específicos IgG para FMB tendem a aparecer após a segunda semana de doença, quando o paciente geralmente está em convalescença. Nesta fase os testes sorológicos têm sua principal aplicação, constituindo a principal ferramenta para a vigilância epidemiológica da doença. Na fase aguda há alta bacteremia e neste período a pesquisa do agente etiológico é o recurso diagnóstico mais indicado.

Os métodos de detecção direta do agente etiológico para FM para seres humanos mais utilizados no Brasil são: isolamento bacteriano e imunohistoquímica. Para o isolamento bacteriano, as amostras devem ser colhidas, mantidas e transportadas em condições que evitem contaminações e mantenham a viabilidade do agente etiológico na amostra. O processamento requer repique em células suscetíveis, seguido de identificação do crescimento através da reação de imunofluorescência direta ou indireta. A imunohistoquímica em fragmentos de tecidos também detecta o agente diretamente apresentando vantagens sobre o isolamento, por não exigir a viabilidade do agente na amostra; possui grande aplicação em casos pós morte. Entretanto, assim como no isolamento bacteriano, o resultado é bastante prejudicado pelo uso pregresso de antibióticos, diminuindo consideravelmente a sensibilidade deste método (Nascimento, 2003; Nascimento *et al.*, 2004; Marrero *et al.* 1989; Quesada *et al.* 2006).

Os métodos moleculares para o diagnóstico da FM em humanos são recentes. Os laboratórios de referência que realizam o diagnóstico de riquetsioses no Brasil têm utilizado de maneira ainda limitada, restringindo-se principalmente a projetos de pesquisa (Horta *et al.*, 2004, Labruna *et al.*, 2004, Nascimento *et al.*, 2005) ou para confirmação de casos pontuais. Os resultados obtidos são bastante promissores, porém sua aplicação à rede pública de saúde para o diagnóstico de riquetsioses ainda é restrita pela falta de incentivo financeiro e ausência de um protocolo único padrão para os laboratórios de referência.

O presente estudo propõe a avaliação de um método molecular sensível e específico (*Nested PCR*) em comparação com a pesquisa de anticorpos, para o diagnóstico de casos fatais de riquetsioses do GFM em amostras de soro.

Os resultados permitirão verificar a utilidade da *Nested PCR* como ferramenta diagnóstica complementar em casos fatais de pacientes com suspeita clínica de FM e, possivelmente indicar este protocolo como padrão para análise em amostras de soro.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. HISTÓRICO DA FEBRE MACULOSA

A história da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (FMMR) inicia no século XIX quando Edward E. Maxcy fez a primeira descrição clínica da Febre Maculosa de Idaho, "uma doença febril caracterizada por uma febre alta contínua e uma erupção purpúrica na pele, aparecendo primeiro nos tornozelos, pulsos e rapidamente espalhando-se por todas as partes do corpo". Em 1904 Wilson e Chowning descreveram 126 casos de FMMR e concluíram que o carrapato do gênero *Dermacentor* era o responsável pela transmissão da infecção. No período de 1906 a 1910, Howard Taylor Ricketts realizou uma série de estudos sobre a doença, isolando o patógeno e demonstrando que este circula entre os carrapatos e mamíferos silvestres. Ricketts comprovou que carrapatos infectados podem transmitir a doença transovariamente para sua prole. Mais tarde, R L Count descreveu achados histopatológicos fundamentais em lesões vasculares de FMMR. Entre 1919 e 1920, Wolbach publicou um estudo detalhado do agente da FMMR, evidenciando que os carrapatos carregam a bactéria, sendo estas de natureza intracelular e infectam principalmente células endoteliais. Wolbach nomeou o agente da FMMR como *Demacentoxenus rickettsi*. Posteriormente, Brumpt em 1922, propõe o nome *Rickettsia rickettsii* em homenagem a Howard Taylor Ricketts (Torres FD, 2007).

Em 1924, o físico Roscoe R. Spencer e o entomologista Ralph R Parker processaram uma vacina de carrapatos infectados; esta foi a primeira vacina feita de corpo de artrópodes vetores. No período de 1925 a 1948, quando os antibióticos foram efetivamente introduzidos, a vacina Spencer-Parker era o principal meio de proteção contra a FMMR. A doença foi identificada na costa marítima oriental dos Estados Unidos e, posteriormente no Canadá, México, Brasil, Colômbia e outros países do hemisfério ocidental. Os nomes dados as riquetsioses variam, geralmente fazendo referência a origem dos casos, por exemplo: no Brasil “Febre Maculosa Brasileira” e “Typho Exanthematico de São Paulo”; na Colômbia “Febre Petechial de Tobia”; e no México “Febre de Choix” e “Febre manchada” (Quintal, 1999).

A descoberta de novas ferramentas genéticas e a utilização de testes de culturas celulares possibilitou a descoberta de novas riquetsioses e erliquioses nos últimos 20 anos. David H Walker e Didier Raoult no capítulo 183 do livro “Principles and Practice of Infectious Diseases” (2004), apresentaram uma retrospectiva histórica das principais doenças causadas por Rickettsias (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Datas históricas das doenças causadas por espécies de Rickettsias

ANO	DESCOBERTA	AUTORES
1760	Descrição do typho exantematico	Boissier de Sauvage
1879	1º caso descrito de <i>typho fluvial</i>	Nagayo
1899	Descrição da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (FMMR)	Maxcy
1906	Isolamento de <i>Rickettsia rickettsii</i>	Ricketts
1909	Papel do piolho do corpo no typho epidêmico	Nicolle
1909	Descrição da Febre Maculosa do Mediterrâneo (FMM)	Conor et al
1911	Isolamento de <i>Rickettsia prowazeki</i>	Nicolle
1914	Papel do carrapato na FMM	Wilson

1921	Identificação de <i>Rickettsia typhi</i>	Mooser
1925	Descrição de “ tache noire ” na FMM	Pieri
1930	1º isolamento de <i>Orientia tsutsugamushi</i> (<i>R.orientalis</i>)	Nagayo
1930	Papel da larva de ácaros na Febre Quintana	Kawarimura
1930	Papel das pulgas no Typhus murino	Dyer
1932	Isolamento de <i>Rickettsia conorii</i>	Brumpt
1935	Descrição do carrapato do Typhus siberiano	Shmatikov et al
1938	Isolamento do <i>Rickettsia sibirica</i>	Krontovuka et al
1940	<i>Rickettsia phagocytophila</i>	Gordon
1940	Descrição do <i>Rickettsialpox</i>	Huebner
1946	Isolamento de <i>Rickettsia akari</i>	Huebner
1946	Isolamento de <i>Rickettsia australis</i>	Plotz e Smadel
1946	Carrapato do Typhus Queensland	Plotz e Smadel
1956	<i>Ehrlichia sennetsu</i>	Kobayashi
1968	Isolamento de <i>Rickettsia slovaca</i>	Brezina et al
1974	Cultura de <i>Rickettsia conorii</i>	Goldwasser
1979	Isolamento de <i>Rickettsia helvetica</i>	Burgdorfer
1981	<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	Anderson
1984	Febre Maculosa Japonesa	Mahara
1985	Cultura de <i>Rickettsia heilongjiangensis</i>	Udida e Walker
1987	1º caso de erliquiose humana nos Estados Unidos	Maeda e McDade
1989	Cultura de <i>Rickettsia japonica</i>	Lov
1990	1º caso humano de Erliquiose granulocitária	Bakken
1990	Isolamento de <i>Rickettsia africae</i>	Kelly
1991	Febre maculosa das ilhas Flinders	Stewart
1992	Identificação molecular de <i>Ehrlichia ewingii</i>	Anderson
1992	1º caso de infecção por <i>Rickettsia africae</i>	Kelly e Raoult
1992	Cultura e identificação de <i>Rickettsia conorii</i>	Tarasevitch e Raoult

1992	Cultura de <i>Rickettsia honei</i>	Baird et al
1993	Cultura e identificação de <i>Rickettsia sibirica</i> e <i>Rickettsia mongolotimonae</i>	Yu e Raoult
1994	1º caso de Febre Maculosa (transmitidas por pulgas)	Schriefer e Azad
1996	Infecção por <i>Rickettsia sibirica</i> e <i>Rickettsia mongolotimonae</i>	Raoult et al
1997	1ª infecção por <i>Rickettsia slovaca</i>	Raoult et al
1997	Cultura de <i>Rickettsia aeschlimanii</i>	Beati e Raoult
1999	Febre Astrakhan	Tarasevitch e Raoult
1999	1º caso humano de <i>E.ewingii</i>	Buller
2000	1º caso de infecção aguda por <i>Rickettsia helvetica</i>	Fournier e Raoult
2000	Cultura de <i>Rickettsia felis</i>	Raoult et al
2002	1º caso de infecção por <i>Rickettsia aeschlimanii</i>	Raoult et al
2004	1º caso de infecção por <i>Rickettsia parkerii</i>	Paddock et al

Em São Paulo, a FMB (riquetsiose do GFM) foi descrita pela primeira vez em 1929, numa área de expansão urbana, onde atualmente estão localizados os bairros paulistanos de Sumaré, Perdizes e Pinheiros. Nesta época recebeu diferentes denominações, sendo o termo “typho exanthematico de São Paulo” o mais frequentemente utilizado na literatura médica da época. Mais tarde, foram descritos focos na periferia da região metropolitana da Grande São Paulo, como os de Mogi das Cruzes, Diadema e Santo André. Com a expansão urbana nessas áreas, esses focos foram desaparecendo, ou tornando-se inativos.

No Estado de Minas Gerais, a doença ressurgiu e focos foram descritos nas décadas de 1930 e 1940 e passou a despertar interesse, sobretudo na região do Vale do Jequitinhonha. Atualmente existem focos ativos nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia e mais recentemente, em Santa Catarina (Madeira *et al.*, 2004, Silva *et al.*, 2010).

No Brasil foram isoladas e identificadas espécies de Rickettsias, conforme a **Tabela 2** (Labruna, 2009).

Tabela 2 - *Rickettsia* spp isoladas de carrapatos no Brasil

Ano	Rickettsia	Espécie de carrapatos	Referência
2007	<i>R. rhipicephali</i>	<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>	Labruna 2007
2004, 2006, 2007	<i>R. bellii</i>	<i>Amblyomma dubitatum</i> (como <i>A. cooperi</i>), <i>A. aureolatum</i> , <i>A. ovale</i> , <i>A. oblongoguttatum</i> , <i>A. rotundatum</i> , <i>A. humerale</i> , <i>A. sculpturatum</i> , <i>A. neumanni</i> , <i>H. juxtakochi</i> , <i>Ixodes loricatus</i>	Horta 2006; Labruna 2004, 2007; Pinter 2006
2004, 2007	<i>Candidatus "R. amblyommii"</i>	<i>A. cajennense</i> , <i>A. coelebs</i> , <i>A. neumanni</i>	Labruna 2004, 2007
2004	<i>Rickettsia</i> sp cepa COOPERI *	<i>Amblyomma dubitatum</i> (como <i>A. cooperi</i>)	Labruna 2004
2006	<i>Rickettsia rickettsii</i> cepa TAIAÇU	<i>A. aureolatum</i>	Labruna 2004
2008	<i>Rickettsia</i> sp cepa AL #	<i>A. longirostre</i>	Ogrzewalska 2008
2004	<i>Rickettsia</i> sp cepa ARANHA #	<i>A. longirostre</i>	Labruna 2004

* Esta rickettsia possivelmente é uma cepa diferente de *R. parkeri*

Estas rickettsias são possivelmente cepas diferentes da *Candidatus "R. amblyommii"*

2.2 PATÓGENO

A bactéria *Rickettsia rickettsii* principal causadora da FM, é de vida intracelular obrigatória, encontrando-se no citoplasma e menos frequentemente no núcleo das células hospedeiras. As riquetsias são pequenas, medindo aproximadamente 0,3-1,0 µm, pleomórficas, gram negativas. As paredes celulares com uma ultraestrutura de bactéria gram-negativa contêm peptidoglicano e lipopolissacarídeos (LPS). Entre as proteínas antigênicas de *R. rickettsii*, duas proteínas de superfície rOmpA (190 kDa) e rOmpB (135 kDa)

contém epítomos que são alvos da imunidade humoral e são as bases antigênicas para a sorotipagem; outros antígenos fazem parte do GFM (Xu Wb *et al.* 1998). A *Rickettsia rickettsii*, como as outras riquetsias retêm a fucsina básica quando corada pelo método de Gimenez e seu cultivo em laboratório requer o uso de hospedeiros de células vivas (modelo animal ou ovos embrionados) ou linhagens celulares: Vero, L-929, HeLa, WI-38, LLC- MK₂, BS-C-1, HEp-2 entre outras (Johnson *et al.*, 1978; Marrero *et al.* 1989). Genomas de várias *Rickettsia spp* já foram sequenciados e este conhecimento tem contribuído para um melhor entendimento do mecanismo da sua patogenicidade, podendo auxiliar no desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas e vacinas (McLeod *et al*, 2004; Renesto *et al*, 2005; Torres, 2007).

Por muitas décadas, *R.rickettsii* foi a única espécie de *Rickettsia* detectada em carrapatos infectados no Brasil. Recentemente *R.bellii* e *R. amblyommii* foram isoladas a partir de carrapatos *Amblyomma spp* no Brasil, e hoje há evidências moleculares da existência de pelo menos três espécies distintas de *Rickettsias* do GFM no Brasil (Horta M C *et al.*, 2004).

Outras espécies de foram reportadas no Brasil: *R.felis* – infectando pulgas, *R.parkeri*, *R.amblyommii*, *R.bellii*, *R.rhipicephali* – infectando carrapatos. Todas classificadas como RGFM, com exceção da *R. bellii*, espécie que está entre o GT e GFM (Labruna 2009).

2.3. MODO DE TRANSMISSÃO E PATOGÊNESE

A bactéria *Rickettsia rickettsii* é transmitida pela picada de um carrapato, o qual atua como reservatório e vetor do patógeno. Quando o carrapato pica um animal para alimentação, ocorre o fenômeno de reativação e as riquetsias passam do estado de dormência: avirulentas, para altamente patogênicas. Este processo requer um período mínimo de incubação, em média de 6 horas a 10 horas, embora possa se prolongar até 24 horas (Thorner *et al.*, 1998; Torres, 2007).

Existe a possibilidade em humanos de adquirir a infecção por *R. rickettsii* através do contato com tecidos ou hemolinfa de carrapatos, pela inalação de aerossóis contaminados (ocorrência somente em laboratórios) ou através de transfusões sanguíneas (Wells *et al.*, 1978; McQuiston *et al.*, 2000).

A infecção das células endoteliais ocorre através da adesão das riquetsias à membrana endotelial através das proteínas rOmpA – que atua como adesina. Já a proteína de superfície rOmpB se liga a receptores celulares Ku70 específicos promovendo alterações na actina do citoesqueleto celular favorecendo a invasão celular. Posteriormente, ocorre a penetração intracelular através do mecanismo de fagocitose, seguido de proliferação e disseminação de numerosos focos de infecção (Silva *et al* 2010, Walker *et al.* 2008).

Diversas espécies de carrapatos estão envolvidas na transmissão da FM, a saber: nos Estados Unidos o *Dermacentor variabilis* (carrapato do cão) é o vetor primário da *R. rickettsii*; o *Dermacentor andersoni* (carrapato da madeira) é o principal vetor na região das Montanhas Rochosas no Canadá; e o *Rhipicephalus sanguineus* (carrapato do cão) é o vetor primário da *R. rickettsii* no México e mais recentemente na região oriental do Arizona. O *Amblyomma cajennense* é o principal vetor nas Américas Central e do Sul. Recentemente, o carrapato *Amblyomma aureolatum* (carrapato amarelo do cão) foi identificado como possível vetor da FM na região de Mogi das Cruzes (leste da região metropolitana da Grande São Paulo). No município de Monte Negro, área central do estado de Rondônia houve a detecção de riquetsias do GFM em carrapatos do gênero *Haemaphysalis* (Pinter e Labruna, 2006, Labruna *et al* 2007).

2.4. EPIDEMIOLOGIA

Na cidade de São Paulo (1929), a doença foi reconhecida pela 1ª vez com relatos de casos circunscritos a áreas suburbanas da capital. No Instituto de Infectologia Emílio Ribas foram notificadas 53 casos no período de 1957 a 1974 e 10 casos entre 1976 e 1982 em municípios vizinhos da capital.

Em 1985 foram notificados casos no município de Pedreira seguindo-se registros em Campinas, São João da Boa Vista, Piracicaba, Salto, Mogi das Cruzes, Santo André, São Bernardo do Campo, Diadema, Ribeirão Pires, Mauá. Outros casos ocorreram nos estados de São Paulo (Branchini *et al.*, 1988; Melles *et al.* 1999; Lemos, 2001) e Minas Gerais (Galvão, 1988; Lemos, 1991; Calic, 2006). Foram registradas ocorrências nos Estados do Rio de Janeiro (Gonçalves *et al.*, 1981), Espírito Santo (Sexton *et al.* 1993), Bahia (Plank *et al.*, 1979) e norte do Paraná (Mancini *et al.*, 1983).

Em meados da década de 80, dezenas de casos suspeitos de FMB, incluindo-se óbitos, foram registradas na região de Campinas (nordeste do Estado de São Paulo), na bacia hidrográfica dos rios Atibaia e Jaguari.

Em 1996, a doença tornou-se de notificação compulsória nas regiões de Campinas (Galvão *et al.*, 2005) e São João da Boa Vista e, em outubro de 2001 (conforme Portaria nº 1943 do Ministério da Saúde) no Brasil foi incluída na lista de doenças de notificação compulsória nacional. No ano de 2002 tornou-se doença de notificação compulsória oficialmente no estado de São Paulo, e um sistema de informatização de notificação foi implantado em 2007.

No período de 2003 a 2008 foram confirmados 240 casos de FMB em território paulista, com 71 óbitos e letalidade que variou de 21,9% a 40,0%. A FMB ocorreu em 61 municípios paulistas, 23 dos quais localizados na região de Campinas. Neste período a doença foi mais freqüente no sexo masculino, na faixa etária acima de 10 anos de idade. O critério de confirmação foi sorológico em 69% dos casos. Não foi possível determinar a situação de risco em 17,5% dos casos (percentual mais elevado nos pacientes que evoluíram para o óbito). Observou-se ainda neste estudo, que o percentual de ocorrência de exantema foi maior naqueles que evoluíram para cura (43,5%). Houve aumento do número de municípios com transmissão da doença, porém não é possível confirmar a ocorrência da expansão das áreas de transmissão ou se os dados refletem uma melhor capacidade de detecção de casos, onde a doença era desconhecida (Katz *et al.*, 2009).

É possível que no Brasil haja subnotificação de casos de FMB em razão das dificuldades no seu diagnóstico clínico, devido ao fato da doença ser facilmente confundida com várias outras: meningococemia, rubéola, leptospirose, infecção por enterovírus, febre tifóide e outros quadros purpúricos (Melles *et al.* 1999).

A ocorrência da FM está sendo registrada nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e, mais recentemente em Santa Catarina. No período de 1995-2003, foram registrados 263 casos da doença, com taxa de letalidade de 28% (Guia de Vigilância Epidemiológica 6ª edição, 2006; Silva *et al.*, 2010).

Em Minas Gerais, neste período, tivemos o registro de 106 casos com frequência maior no sexo masculino (76%), na faixa etária de 15 a 30 anos, letalidade média de 18% e maior incidência no mês de outubro. A sazonalidade esteve relacionada com o ciclo evolutivo dos carrapatos, tendo em vista que as formas infectantes (ninfas e adultos) são mais encontradas neste período. As regiões com maior número de casos no estado foram os vales do Rio Doce, Mucuri e Jequitinhonha, localizados na região nordeste de Minas Gerais.

Em São Paulo, de 1995 a 2003 foram registrados 83 casos, a frequência foi maior no sexo masculino (73%), a faixa etária mais acometida foi de 20-30 anos e letalidade média de 47%. As regiões com maior número de casos foram Campinas e Pedreira.

No Rio de Janeiro, durante o período de 1980-2003 foram registrados 57 casos, com taxa de letalidade de 23% e, a região com maior frequência foi Barra do Piraí.

No Espírito Santo, ocorreram surtos nos municípios de Pancas, Barra de São Francisco e Nova Venécia.

No Estado de Santa Catarina, de outubro de 2003 a abril de 2004 foram notificados 11 casos da doença, ocorridos na região do médio Vale do Itajaí, sem registro de óbitos. Todos os casos de Santa Catarina, apesar de oligo ou assintomáticos, foram sorologicamente reagentes, sugerindo uma infecção por

outras riquetsias não patogênicas ou de menor patogenicidade que a *R.rickettsii* (Guia de Vigilância Epidemiológica 6ª edição, 2006; Silva *et al.*, 2010).

Entre 2001 e 2002 ocorreram oito óbitos por FMB confirmados laboratorialmente (registros do Laboratório de Riquetsias do IAL e do Centro de Vigilância Epidemiológica/ SP) em localidades situadas tanto na região de Campinas, como no município de Mogi das Cruzes. Neste último município, situado a leste da capital, que alberga um antigo foco da doença (Melles *et al.*, 1992), foram registrados 4 óbitos por FMB, provavelmente transmitida por *Amblyomma aureolatum* (Pinter e Labruna 2006). Em setembro de 2002, o óbito de uma criança no campus da Escola Superior Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo em Piracicaba (09/2002) e o registro de um caso no município de Ribeirão Pires em abril de 2003, ambos com confirmação laboratorial pelo IAL de São Paulo, sugerem a existência de outros focos no estado de São Paulo. Em 2004 foram confirmados pelo Laboratório de Riquetsias do IAL, 42 casos no estado de São Paulo, sendo 11 fatais, o maior número ocorreu na região de Campinas, sendo 7 do município de Vinhedo.

De acordo com o boletim da Vigilância Epidemiológica (http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/cve_fmb.html), o ano de 2005 registrou o maior número de casos (55) no Estado de São Paulo, devido a um surto da doença na região de Piracicaba (12 casos). Em 2008 foi registrado o maior número absoluto de casos fatais (16 casos).

Nos anos de 2006 a 2008 o número de casos variou entre 34 e 38, com taxa de letalidade de 23,5 % (em 2007) a 34,2% (em 2006). Neste período, a região de Campinas se manteve como principal região endêmica seguido por alguns municípios da Grande São Paulo, São Bernardo do Campo e Diadema.

Os dados epidemiológicos da FM nos últimos anos indicam que os focos da doença continuam ativos, sendo preocupante o número de casos fatais. O número de suspeitas clínicas da doença também aumentou de cerca de 400, em 2004, para quase 2000 casos nos anos seguintes, evidenciando aumento na vigilância da FM aos pacientes, nas regiões endêmicas.

2.5. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As manifestações clínicas da FMB apresentam um espectro de gravidade que varia em função do tempo de evolução da doença, de quadro clínico brando e inespecífico nos primeiros dias e, com súbita progressão para formas graves e, frequentemente fatais. A doença é de difícil diagnóstico, sobretudo na fase inicial. Em virtude de ser uma doença vascular multissistêmica, a FM pode apresentar um curso clínico variável, desde quadros clássicos a formas atípicas sem exantemas. O início geralmente é abrupto e os sintomas são inespecíficos, incluindo febre (em geral elevada), cefaléia, mialgia intensa, mal estar generalizado, náuseas e vômitos. O período médio de incubação é de aproximadamente 7 dias, com limites entre 2 a 14 dias (Silva *et al* 2010).

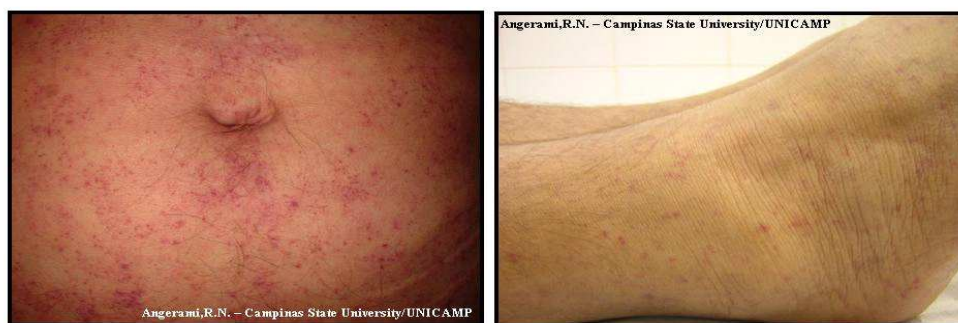
Tendo em vista a capacidade das riquetsias de infectarem células endoteliais de todo o organismo, a vasculite disseminada produz apresentações clínicas variadas, sendo observadas manifestações: cutâneas, musculoesqueléticas, cardíacas, pulmonares, gastrintestinais, renais e neurológicas. A febre é a manifestação clínica inicial, durante o curso da doença, surgem cefaléia intensa, mialgia, artralgia, astenia, inapetência, dor abdominal, náusea e vômito. A inespecificidade do quadro clínico inicial, tanto a FMB quanto a FMMR são frequentemente confundidas com outras doenças como: dengue, leptospirose, doença meningocócica, rubéola, entre outras.

Febre, cefaléia e exantema constituem a “tríade clínica clássica” da FMMR. Entretanto, o exantema ocorre com frequência variável de 44 a 70% durante a evolução da doença. Menos de 5% dos pacientes apresentam esse conjunto de sintomas nos primeiros três dias da doença.

O exantema, a principal característica da doença, ocorre geralmente após o terceiro dia do início dos sintomas. Inicia-se com um padrão maculopapular acometendo punhos, tornozelos e, posteriormente, palma das mãos e planta dos pés. Com a progressão da doença observa-se uma tendência de disseminação centrípeta do exantema, com acometimento dos

braços, pernas e tronco e a evolução para um padrão petequial difuso, indicando a progressão da lesão endotelial (**Fig 1**).

Figura 1 - Exantema petequial da FMB



Fonte: Angerami RN – UNICAMP, São Paulo, 2007.

A taxa de letalidade da doença nos EUA parece ser menor do que a observada no Brasil. Para FMRR, as taxas de letalidade variam de 20 a 66% em casos não tratados e de 4 a 10% em casos tratados inadequadamente.

No caso da FMB, observam-se elevadas taxas anuais de letalidade alcançando 75% no Estado de São Paulo e, 80% no estado de Minas Gerais. Recentemente, a letalidade média é de 27% no Brasil, variando de 24% no estado de Minas Gerais, 34% no Rio de Janeiro, 25% no Espírito Santo e 36% no Estado de São Paulo. Acredita-se que a elevada letalidade da FMB, deva-se a demora no diagnóstico com conseqüente atraso na terapia específica, limitações das formulações terapêuticas disponíveis e possibilidade de virulência maior da *R. rickettsii* no Brasil (Angerami *et al*, 2008, Silva *et al* 2010).

2.6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Os recursos laboratoriais disponíveis para o diagnóstico das riquetsioses baseiam-se na detecção sorológica ou etiológica do agente causal. Os testes sorológicos usuais possibilitam reconhecer os principais grupos de riquetsias,

GFM e GT, porém, não permitem a identificação da espécie do agente.

Várias metodologias foram desenvolvidas para o diagnóstico das riquetsioses como: reação Weil Felix, Fixação do Complemento (FC), Hemaglutinação Indireta (HI), ELISA, Microimunofluorescência, Western Immunoblotting e Imunofluorescência indireta (IFI). A metodologia da HAI detecta anticorpos IgG e IgM, porém a aglutinação é mais eficiente com anticorpos IgM, a FC possui baixa sensibilidade especialmente na fase precoce da doença, em especial para a FMMR, podendo ser utilizada em estudos soroepidemiológicos (La Scola *et al.*, 1997; Walker *et al.*, 1978).

A microimunofluorescência modificada por Wang 1978 foi sugerida para identificar vários agentes causadores de riquetsioses simultaneamente. Esta metodologia detecta anticorpos IgG e IgM para vários antígenos riquetsiais (acima de nove) na mesma alíquota de soro e pode ser utilizada para diagnósticos de casos da doença e estudos soroepidemiológicos (Philip *et al.*, 1978; Wang *et al.*, 1978; Orsmsbee *et al.*, 1977).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) detecta anticorpos IgG e IgM; é amplamente utilizada em centros de referência para riquetsioses como Center for Disease Control and Prevention (CDC) Atlanta/ EUA e muitos laboratórios de Saúde Pública. É uma metodologia simples e econômica, possui uma sensibilidade de até 90% podendo ser utilizada no diagnóstico da doença e em estudos soroepidemiológicos, A RIFI também pode ser utilizada para identificação indireta do crescimento bacteriano no isolamento em cultura de células (Brezina *et al.*, 1985; La Scola *et al.* 1997).

Na escolha da metodologia sorológica a ser utilizada no diagnóstico da FM devem ser consideradas a sensibilidade, especificidade e a duração do período necessário para o aparecimento de títulos de anticorpos detectáveis.

Para confirmação após a triagem recomendam-se testes com alta especificidade, evitando falsos positivos, nestes casos, para os ensaios imunológicos, deve-se considerar a quantidade e custo dos antígenos

necessários e o material mínimo requerido (Nascimento, 2003; La Scola *et al.* 1997).

Diferentes riquetsioses podem apresentar manifestações clínicas semelhantes e a escolha da metodologia sorológica deve seguir uma avaliação criteriosa, tendo em vista que determinados antígenos podem fornecer resultados positivos em função da existência de reações cruzadas entre as riquetsias (Johnson *et al.* 1978; Walker *et al.* 1978).

Além da metodologia sorológica tradicional, a introdução da metodologia molecular tem proporcionado aumento da sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da Febre Maculosa. Atualmente vem sendo implementada em centros de pesquisa como uma importante ferramenta para vigilância epidemiológica das riquetsioses, em relação aos aspectos ambientais (espécies envolvidas, agentes sentinelas, como vetores e hospedeiros) e na saúde humana (aprimoramento do diagnóstico).

Uma das primeiras aplicações da biologia molecular foi para identificação e caracterização das espécies de riquetsias que causam impacto na saúde humana. Foi proposto um método capaz de identificar nove espécies dentro do GFM, através da reação em cadeia pela polimerase (PCR), cuja região gênica alvo foi o gene *ompA* (codifica uma das principais proteínas antigênicas de superfície de 190 kDa), seguido de análise dos tamanhos dos fragmentos após digestão com enzimas de restrição específicas (PCR-RFLP). Posteriormente, a combinação deste método com outro PCR-RFLP, que analisa fragmentos do gene que codifica a proteína de superfície *rOmpB* (120 kDa), permitiu a identificação de 26 espécies dentro do GFM, porém não foi possível identificar as espécies *R. africae* e *R. parkeri* (Eremeeva, *et al.*, 1994).

Com o desenvolvimento do sequenciador automático, a análise das sequências dos produtos amplificados tornou-se mais acessível para a identificação das riquetsias. Após a análise do genoma de várias espécies de riquetsias, tanto do GFM como GT, cinco (5) genes foram propostos para serem

utilizados na identificação das riquetsias: a região que codifica o 16S rRNA, a proteína de 17kDa, a citrato sintase, os antígenos de superfície *ompA* e *ompB*.

A análise da sequência do 16S rRNA é útil para identificar o gênero, não sendo ideal para identificação da espécie, pois trata-se de uma região bastante conservada entre o gênero *Rickettsiae* (Roux, *et al.*, 1995).

O gene da citrato sintase (*gltA*) é um dos principais alvos utilizados atualmente, constitui de regiões conservadas flanqueando regiões polimórficas possibilitando, de acordo com o desenho dos *primers*, a identificação do gênero, do grupo, bem como de muitas espécies, porém não todas (Roux, *et al.*, 1997).

As sequências de nucleotídeos na região 5' final dos antígenos 190-kDa (*ompA*) e 120-kDa (*ompB*) possuem importantes diferenças gênicas, bem como sequências repetitiva, permitindo a distinção de quase todas as espécies do GFM, inclusive variações intraespécies entre isolados, como já foi descrito para *R. conorii* e posteriormente *R. rickettsii* (Eremeeva *et al.*, 1994).

Em estudos de filogenia, recentemente estão sendo pesquisadas também variações genéticas no gene D, o qual codifica uma proteína antigênica termoestável PS120. A análise de sequências variantes neste gene possui as mesmas aplicações que o *ompA* e *ompB* (Sekeyova *et al.*, 2001).

O gene que codifica o antígeno 17-kDa é uma das regiões gênicas mais estudadas no genoma da riquetsias, estando presente tanto no GFM como GT. Trata-se de uma região gênica muito conservada, porém com divergências entre GFM e GT. Na **Figura 2** é possível observar o alto grau de homologia dentro do GFM e os pontos de divergência entre GFM e GT.

Alguns dos métodos moleculares mais sensíveis se baseiam nas regiões 17-kDa e são utilizados na vigilância epidemiológica ambiental (vetores e hospedeiros) e para o diagnóstico em amostras clínicas humanas (Tzianabos *et al.*, 1989; Schattner *et al.*, 1992; Leitner *et al.*, 2002; Labruna *et al.*, 2004, Blair *et al.*, 2004; Eremeeva *et al.*, 2006).

Figura 2. Alinhamento das sequências de nucleotídeos para o gene riquetsial 17-kDa.

		-35	-10	+1	->	
Rr	1	TTTACAAAAT	TCTAAAAACC	ATATACTTAT	T.AATTATATA	..TTAATTAGA 50
Rc	1					50
Rt	1					48
Rp	1					47
		FMET ----->				
Rr	51	GAGAATTATA	TGAAACTATT	ATCTAAAATT	ATGATTATAG	CTCTTGCAAC 100
Rc	51					100
Rt	49	- -		G A	T	G 96
Rp	48	G		A		G 97
Rr	101	TTCTATGTTA	CAAGCCTGTA	ACGGT	TCGGG	CGGTATGAAT AAACAAGGTA 150
Rc	101					150
Rt	97		A	T	T	C G 146
Rp	98		T	T	A A T	C 147
Rr	151	CAGGAACACT	TCTTGGCGGT	GCTGGCGGCG	CATTACTTGG	TTCTCAATTC 200
Rc	151					200
Rt	147	T	T	C	C	T 196
Rp	148	C T	T C	C A	A T	197
Rr	201	GGT.AAGGGCA	AAGGACAGCT	TGTTGGAGTA	GGTGTAGGTG	CATTACTTGG 250
Rc	201					250
Rt	197	- C C T	A	C		C 246
Rp	198	C -T	A	C		C 247
Rr	251	AGCAGTTCCT	GGTGGACAAA	TCGGTGCAGG	TATGGATGAA	CAGGATAGAA 300
Rc	251					300
Rt	247	G		A	C	G 296
Rp	248	G		C		G 297
Rr	301	GACTTGC.AGA	GCTTACCTCA	CAGAGAGCTT	TAGAAACAGC	TCCTAGTGGT 350
Rc	301					350
Rt	297	A - T	A A A	A	T T	C 346
Rp	298	- T	A A A	A	T T A	C 347
Rr	351	AGTAACGTAG	AATGGCGTAA	TCCGGATAAC	GGCAATTACG	GTTACGTAAAC 400
Rc	351					400
Rt	347	A	C	A	T	CT 396
Rp	348	A	G	A		CT C 397
Rr	401	ACCTAATAAA	ACTTATAGAA	ATAGCACTGG	TCAATATTGC	CGTGAGTACA 450
Rc	401					450
Rt	397		G	C T A		A 446
Rp	398		G	C TG A		A 447
Rr	451	CTCAAACAGT	TGTAATAGGC	GGAAAACAAC	AAAAAGCATA	CGGTAATGCA 500
Rc	451					500
Rt	447		G		C A	T A 496
Rp	448	A		-	- -	T 494
Rr	501	TGCGGC	CAAC	CTGACGGACA	ATGGCAAGT	GTGAATTGA 539
Rc	501					539 99.84
Rt	497					535 88.74
Rp	495	T	T	G		533 88.14

Foram alinhadas sequências de *R. rickettsii* como referência e nas linhas seguintes apenas os nucleotídeos que diferem. Estão indicados deleções (-) e inserções (.). As sequências alinhadas são: *R. rickettsii* (Rr), *R. conorii* (Rc), *R. typhi* (Rt) e *R. prowazekii*. Estão indicados regiões promotoras (-35 e -10), sítio de iniciação (+1), metionina iniciadora (fMet) e região de anelamento dos *primers* utilizados neste estudo (Nested PCR), externos em preto e internos em vermelho (Anderson *et al.*, 1989).

3. RETROSPECTIVA LABORATORIAL

No ano de 1985, o Laboratório de Riquetsias do IAL reinicia as atividades tendo como principal atribuição realizar o diagnóstico sorológico em amostras de indivíduos com suspeita de FMB, provenientes de áreas endêmicas do estado de São Paulo e de outros estados do Brasil.

Um estudo retrospectivo da análise sorológica no laboratório mostra que a princípio utilizava-se a reação de Weil Felix, metodologia de fácil execução e baixo custo, entretanto com baixa sensibilidade e especificidade. Tornou-se então necessária a implantação de uma nova metodologia mais específica e sensível. A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) passou a ser utilizada para o diagnóstico das riquetsioses utilizando-se antígeno específico para o Grupo da Febre Maculosa ou para Grupo Tifo. A RIFI para FM foi padronizada e implantada sendo utilizado antígenos de *Rickettsia rickettsii* (cepa Sheila Smith) fornecido pelo CDC/Atlanta-EUA.

Em 1989, o laboratório passou a ser Centro Colaborador da Organização Panamericana de Saúde e da Organização Mundial de Saúde no Sistema de Vigilância Global das Riquetsioses e Referência Regional das Riquetsioses, com a principal missão de realizar diagnósticos sorológicos e etiológicos das riquetsioses em amostras de pacientes procedentes de áreas endêmicas dos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná e Goiás, com ênfase no diagnóstico sorológico da FMB.

Com o decorrer dos anos, novas áreas endêmicas foram sendo descobertas, novos estudos e conhecimentos sobre a doença foram adquiridos, levando a busca por melhoramentos no diagnóstico visando obtenção de resultados mais precisos e conclusivos.

Em 1999, a Pesquisadora Heloisa H B Melles estabeleceu no laboratório de Riquetsias do IAL uma metodologia para o isolamento de riquetsias em cultura de células Vero "shell vial", a partir de amostras de coágulo ou biópsia de pele resultando no primeiro método de diagnóstico precoce e na fase aguda

da doença. Observa-se nesta fase, a alta riquetsemia ocorre quando ainda não há anticorpos detectáveis no soro. O isolamento em cultura celular foi padronizado através da inoculação de amostra padrão de *Rickettsia rickettsii*, cepa Sheila Smith (CDC) e, posterior identificação feita através da RIFI. A presença de microorganismo com coloração verde fluorescente visualizado no interior do citoplasma das células caracteriza o crescimento do agente. Posteriormente, a metodologia foi consolidada na rotina para do isolamento do agente da FM em amostras de biópsia de pele de paciente, bem como de amostras de carrapatos do gênero *Amblyomma*, considerado como reservatório e transmissor da doença no Brasil (Lemos *et al.*, 2001). A metodologia permaneceu na rotina para diagnóstico da FM no laboratório, possibilitando não somente a detecção da doença precocemente, mas a construção de um banco de isolados viáveis de regiões endêmicas do Brasil, o qual será alvo de estudos sobre caracterização e filogenia das riquetsias brasileiras.

Devido à exclusividade no diagnóstico da FMB, a casuística anual do Laboratório de Riquetsias reflete diretamente a situação epidemiológica nos Estados de São Paulo e Santa Catarina, sendo a principal ferramenta de apoio aos Centros de Vigilância Epidemiológica.

Em 2004, de 415 exames sorológicos realizados, 40 foram positivos, sendo 35 (35/393 - 8,90%) do Estado de São Paulo e 5 (5/22 - 22,73%) de Santa Catarina (LACEN-SC), dos 106 isolamentos realizados, 10 foram positivos. As principais regiões que encaminharam amostras com pedido para exame de Febre Maculosa foram Campinas (IAL) com 279 (28 positivos), Rio Claro (IAL) com 81 (5 positivos), Grande São Paulo com 66 (14 positivos).

Em 2005, de 1368 exames sorológicos realizados, 77 foram positivos, sendo 52 (52/1314 - 3,96%) do Estado de São Paulo e 24 (24/53 - 45,28%) de Santa Catarina (LACEN-SC), dos 335 isolamentos realizados, 8 foram positivos. As principais regiões que encaminharam amostras para exame de FM foram Campinas (IAL) com 778 (25 positivos), Rio Claro (IAL) com 480 (12 positivos),

Grande São Paulo com 311 (14 positivos), Sorocaba (IAL) com 152 (1 positivo) e Santo André (IAL) com 77 (3 positivo).

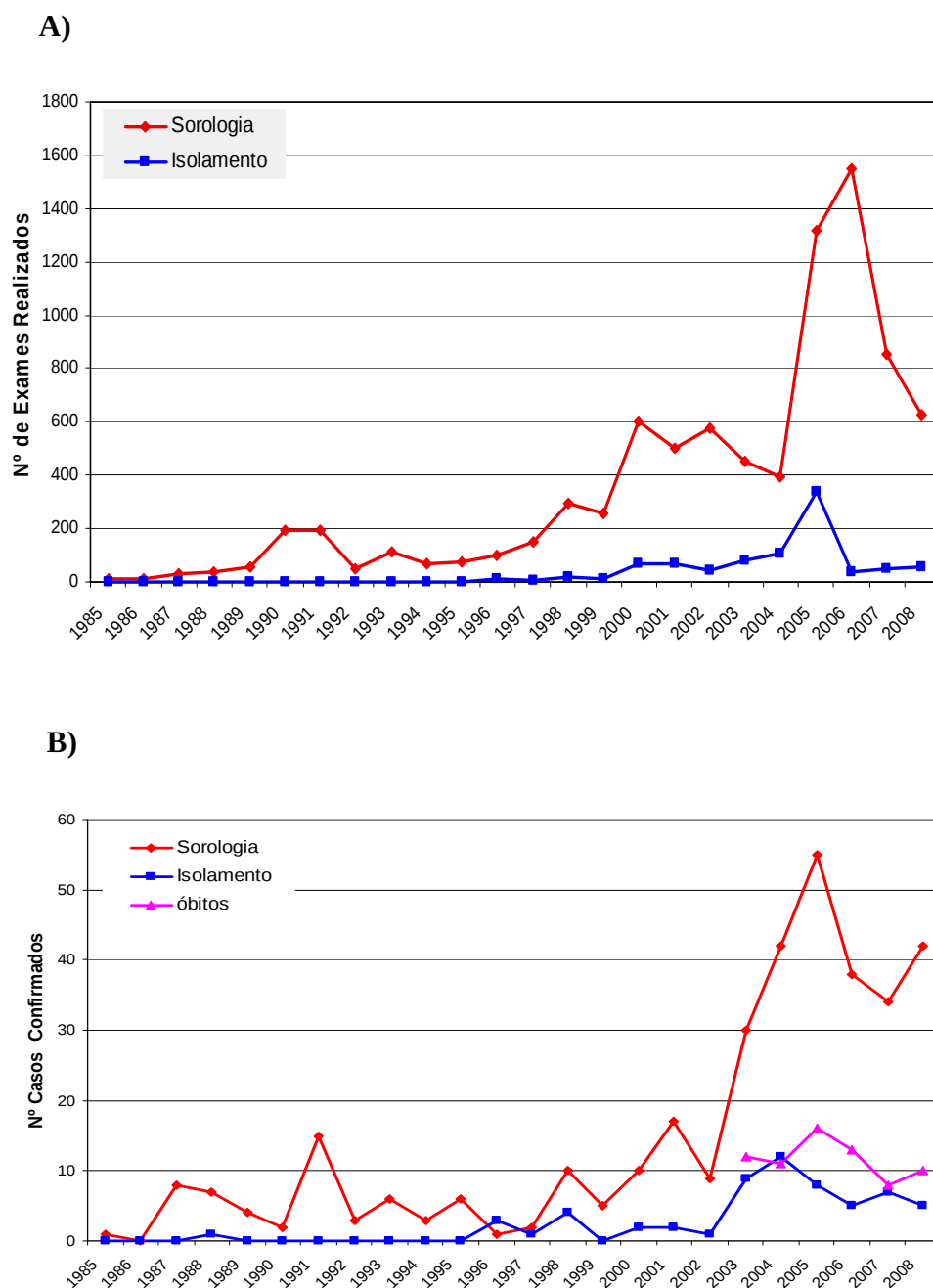
Em 2006 foram realizados 1727 exames sorológicos em casos suspeitos, sendo 67 confirmados e, 32 isolamentos com 5 positivos. Em SP, 27 de 1551 foram confirmados sendo que 8 evoluíram para óbito. Em SC, 36 de 132 foram confirmados não sendo constatado nenhum caso de óbito. Em relação à procedência dos pedidos de exame em SP, as principais regiões foram Campinas 789 (16 positivos), Grande São Paulo 255 (6 positivos) e Rio Claro 268 (2 positivos). Casos positivos foram detectados também em Santos (1), Caraguatatuba (1) e São José do Rio Preto (1).

Em 2007 foram confirmados pela sorologia 68 casos de 972 suspeitos e, 7 de 79 pelo isolamento. Em SP, foram confirmados 27 de 855 casos sendo 7 casos fatais. Em SC, 45 de 124 novos casos foram confirmados, não ocorrendo casos fatais. Foram realizados 555 (17 positivos) da região de Campinas, 111 (3 positivos) da Grande São Paulo, 75 (3 positivos) da região de Rio Claro. Casos positivos detectados também em Cândido Mota (1), Marília (1), Ourinhos (1) e Ubatuba (1).

Em 2008 foram confirmados pela sorologia 56 de 748 suspeitos e, 5 de 59 foram confirmados pelo isolamento. Em SP, 39 de 626 foram confirmados sendo que 5 casos evoluíram para óbito. Em SC, 15 de 57 novos casos foram confirmados. Foram realizados 402 (18 positivos) exames da região de Campinas, 87 (13 positivos) da Grande São Paulo e 39 (5 positivos) da região de Rio Claro, outros 5 casos foram detectados da região de Marília.

Os dados laboratoriais mostram que a FMB é uma doença de impacto na saúde pública no Estado de São Paulo, onde há ocorrência de casos fatais. Apesar de ter ocorrido uma tendência de queda no número total de pedidos de exames entre 2007 e 2008, sugerindo menor número de casos suspeitos, o número de casos positivos, incluindo óbitos permanece significativo, tendendo a aumentar com a utilização de novas metodologias diagnósticas mais sensíveis (**Fig 3 A e B; Fig 4 A e B; Fig 5 A e B**).

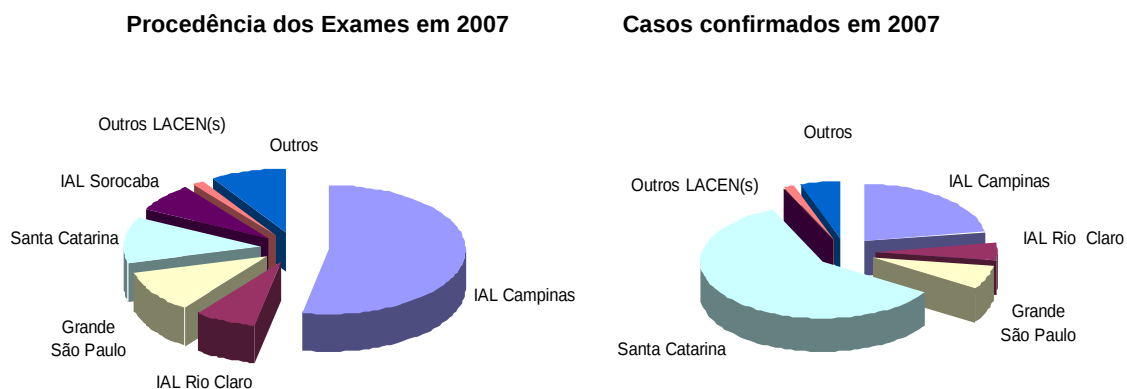
Figura 3 – Número de exames para diagnóstico de FMB realizados no Laboratório de Riquetsias do Instituto Adolfo Lutz no período de 1985-2008. Em **A** o número total, em **B**, número de casos confirmados.



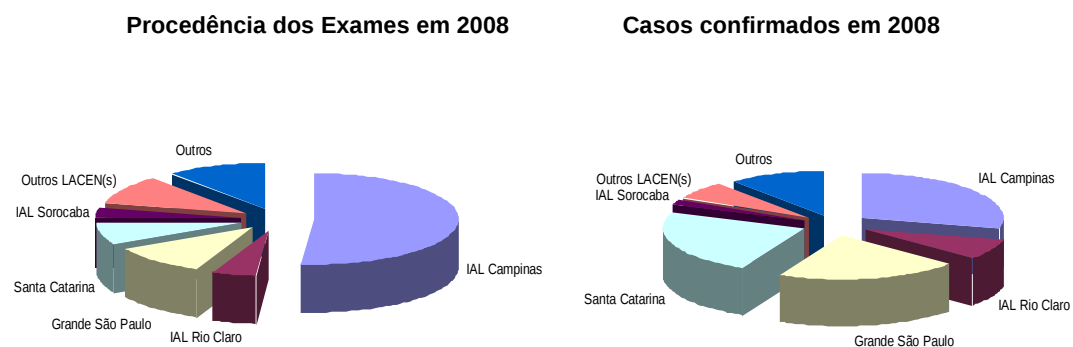
Fonte: Santos, FCP- Laboratório de Riquetsias, 2009

Figura 4 – Distribuição dos casos suspeitos e casos confirmados de FMB em relação à procedência no ano de 2007 (**A**) e 2008 (**B**).

A)

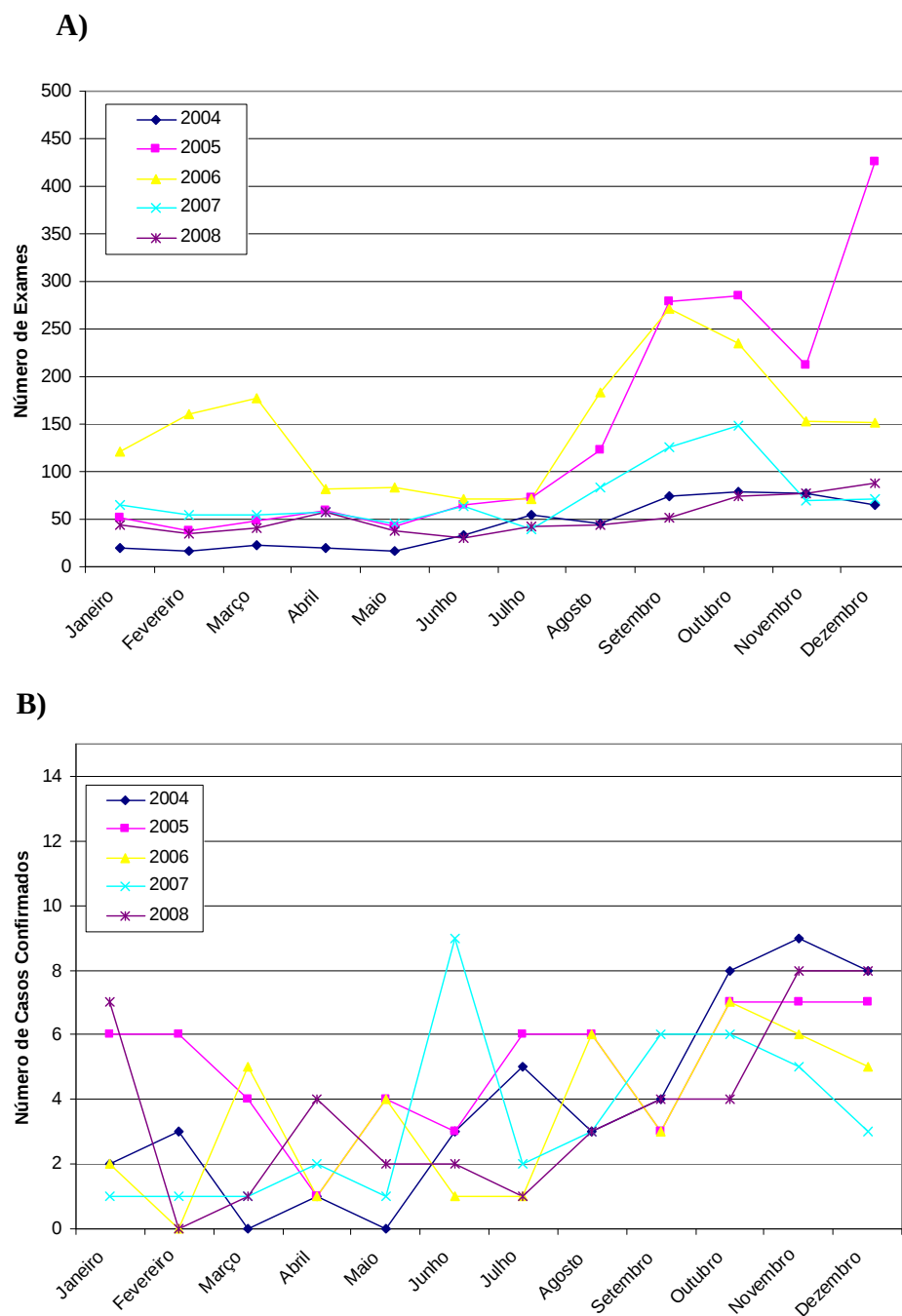


B)



Fonte: Santos, FCP- Laboratório de Riquetsias, 2009

Figura 5 - Distribuição dos casos suspeitos (em **A**) e confirmados (em **B**) de FMB, pelos meses do ano, de 2004 a 2008.



Fonte: Santos, FCP- Laboratório de Riquetsias, 2009

4. JUSTIFICATIVA

Os dados registrados no Laboratório de Riquetsias indicam que em determinadas situações os exames laboratoriais usualmente empregados (cultura em células Vero “shell vial” e sorologia pela RIFI) não permitem o diagnóstico conclusivo dos casos que apresentam clínica compatível com FMB, tornando-se então necessário a busca de novas metodologias de avaliação diagnóstica, que possibilitem auxiliar e fornecer resultados mais precisos e conclusivos, particularmente em casos fatais, quando as amostras são limitadas.

Segundo La Scola e Raoult 1997, a metodologia PCR deve ser uma alternativa para o diagnóstico precoce da doença, possibilitando a detecção antes da soroconversão.

Em 2005, Nascimento e colaboradores, utilizando a PCR, verificaram a presença de *Rickettsia rickettsii* em amostra de sangue humano de alguns pacientes com FMB confirmado pela sorologia (RIFI) com antígeno fornecido pelo CDC e isolamento em cultura de células Vero. As regiões gênicas *ompA* e *ompB* foram sequenciadas confirmando a espécie envolvida.

Esses dados iniciais indicam que as metodologias moleculares poderão acrescentar sensibilidade e especificidade aos métodos tradicionais utilizados para o diagnóstico da FMB, contribuindo para melhor entendimento da doença em seus aspectos epidemiológicos, clínicos, permitindo um delineamento adequado de estratégias de prevenção e de controle da doença.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi de avaliar a aplicabilidade do teste *Nested* PCR para detecção molecular de Riquetsias do Grupo da Febre Maculosa Brasileira em casos suspeitos da doença, que evoluíram para óbito.

5.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste projeto foram:

- Utilizar a reação de *Nested* PCR em amostras de soro para pesquisa de riquetsias do GFM em amostras de pacientes suspeitos de FMB, que evoluíram para óbito;
- Confirmar os casos positivos através do sequenciamento dos fragmentos amplificados e análise do grau de similaridade com riquetsias do GFM através dos bancos genômicos públicos;
- Comparar os resultados da *Nested* PCR com os obtidos pela sorologia e/ou isolamento em cultura de células.

6. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Casuística

O grupo de estudo foi constituído por 50 indivíduos com suspeita clínica de FM que apresentaram sintomatologia grave e evoluíram para óbito (≤ 10 dias), de regiões sabidamente endêmicas para a doença. As amostras destes pacientes foram encaminhadas ao Laboratório de Riquetsias do IAL entre os anos de 2006 a 2009, para a realização dos testes de sorologia por imunofluorescência indireta e/ou isolamento em cultura de células, os quais são oferecidos à rede pública de saúde pela Instituição.

A idade dos pacientes variou entre 2 e 73 anos ($36,65 \pm 21,59$), de ambos os sexos, sendo 36 (72%) do sexo masculino (**Apêndice 2**).

6.1.1. Aspectos Éticos

As amostras utilizadas neste estudo fazem parte do conjunto de amostras encaminhadas ao Laboratório de Riquetsias do IAL para diagnóstico laboratorial da FMB através dos exames disponíveis à rede pública de saúde, a saber: a sorologia pela RIFI e isolamento de RGFM. Com a mesma finalidade pelas quais foram colhidas também e, foram testadas com a metodologia complementar proposta neste estudo.

O presente trabalho contou com a colaboração dos médicos sanitaristas e infectologistas: Dr Rodrigo Nogueira Angerami do Núcleo de Vigilância Epidemiológica da UNICAMP, em Campinas e Dra Gizelda Katz do Centro de Vigilância Epidemiológica de São Paulo; e apoio e aprovação da Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB) da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde.

Este trabalho foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos - CEPIAL do Instituto Adolfo Lutz (Projeto de Pesquisa nº CCD-BM 48/07, protocolo nº 34/2009) – **Apêndice 1**

6.2. Material e Métodos

6.2.1. Amostras Clínicas

Foram utilizadas amostras de soros de pacientes com suspeita clínica de FM, encaminhadas pela rede pública ao Laboratório de Riquetsias para diagnóstico sorológico de FM no período de 2006 a 2007. O grupo analisado foi constituído por 50 amostras de soro de pacientes com suspeita de FM que evoluíram a óbito em até 13 dias a partir do surgimento dos sintomas. Os soros foram processados durante a rotina do laboratório para pesquisa de anticorpos específicos para GFM através da RIFI. Amostras de coágulos e/ou de biópsias de lesões foram processadas para o isolamento em cultura de células (quando foram enviadas).

6.2.2. Pesquisa de Anticorpos contra FM - RIFI

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) foi utilizada para detecção dos títulos de anticorpos anti-*R. rickettsii* IgG e IgM nos soros humanos. Os antígenos utilizados para confecção das lâminas de RIFI foram produzidos no Laboratório de Riquetsias do IAL a partir de isolado de amostra clínica e caracterizado por sequenciamento de DNA nas regiões *ompA*, *ompB* e *gltA* como *R. rickettsii* (Nascimento *et al.*, 2005). Na RIFI, uma alíquota de soro foi diluída em PBS (diluição seriada a partir de 1:64) e, em seguida colocada sobre a lâmina contendo os antígenos de riquetsias. Após incubação em estufa (37°C, 30 minutos) a lâmina foi lavada com PBS. A cada lâmina foi adicionado o conjugado específico (globulina anti IgG ou IgM humana marcada com

fluoresceína) diluído no corante Azul de Evans (0,01%). Após nova incubação (37°C, 30 minutos) e lavagem com PBS, as lâminas foram cobertas com lamínula com glicerina tamponada (com 10% de PBS) na interface (Philip *et al.* 1976). A leitura da lâmina foi realizada em microscópio de fluorescência modelo LABOPHOT da marca NIKON no aumento de 10 e 40X. Foram observadas nos casos positivos: Riquetsias intra e extracelulares com formato característico do GFM (predominantemente cocobacilos), fluorescentes, de contornos regulares e coloração verde-maçã, densa e brilhante; e nos casos negativos: ausência de fluorescência intra e extracelular compatível com o formato característico do GFM. Foram considerados positivos os soros com títulos >64.

6.2.3. Isolamento para Riquetsias do GFM - “Shell vial”

No sistema “shell vial” modificado por Melles *et al* 1999, foram utilizadas células Vero (rim de macaco verde africano) e um tubo de vidro de 14 mm de diâmetro com aproximadamente 100 mm de altura, no fundo do qual foi adaptada uma lamínula circular de 12 mm de diâmetro aderida com aproximadamente 1×10^5 células Vero (1 ml de cultura) e 1 ml de meio de manutenção, meio MEM (GIBCO/BRL). Após um dia de cultivo das células Vero, o meio foi descartado e adicionado sobre a monocamada de células Vero 0,1 - 0,3 ml de coágulos sanguíneos e ou fragmento de biópsia de pele homogeneizado em meio BHI. Em seguida, os tubos foram centrifugados (700g, 60 min, 25°C), e adicionado de 1 ml de MEM acrescido de 5% soro fetal bovino, 10 µg/ml de glutamina, 10 µg /ml de vancomicina e 20 µg /ml de estreptomicina. As culturas foram incubadas a 37°C por 5 dias.

Após o período de incubação, um tubo de cada amostra juntamente com o controle positivo e negativo teve o meio de cultura descartado e foram fixados em acetona (resfriada por 4 a 8 °C) por 10 min. Em seguida, a RIFI (utilizando-se soro humano sabidamente positivo e conjugado anti IgG marcado com fluoresceína) foi realizada sobre as lamínulas circulares internas aos tubos

contendo a cultura celular. As amostras positivas apresentaram em análise no microscópio de fluorescência (modelo LABOPHOT da marca NIKON no aumento de 10 e 40X) um padrão de fluorescência que caracteriza o crescimento geralmente em foco de bactérias de tamanho e forma compatível com riquetsias do GFM e a negativa ausência de fluorescência intra e extracelular compatível com o formato característico do GFM.

6.2.4. Extração do DNA em amostras de soro

Para rápida e eficiente purificação de ácido nucléico viral em amostras livres de célula, o DNA foi extraído de acordo com o protocolo do Kit PureLink™ Viral RNA/DNA (Invitrogen). Brevemente, a 200 µL de soro foram adicionados 200 µL do tampão de lise (kit) e 25 µL de proteinase K (17,8 mg/mL), seguido de incubação a 56°C por 15 min. Após a incubação, 250 µL de etanol absoluto foram adicionados. A mistura foi agitada no vortex e adicionada à coluna seguida de centrifugação rápida. A coluna foi lavada e o DNA foi eluído com 25 µL de água estéril livre de RNase e DNase (kit), após incubação por 1 min a temperatura ambiente e centrifugação a 14.000g por 1 min. A solução de DNA foi armazenada a -70°C até o momento do uso (Sambrook *et al.* 1989).

6.2.5. Diagnóstico Molecular – *Nested* PCR

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho visaram maior sensibilidade para detecção dos agentes, por isso foram escolhidos protocolos de *Nested* PCR que adicionam ao método uma sensibilidade de até 100 vezes em relação ao PCR simples (Choi *et al.*, 2005). Os protocolos utilizados neste trabalho foram otimizados no Viral and Rickettsial Zoonoses Branch, Division of Viral and Rickettsial Diseases, National Center for Infectious Disease, Center for

Disease Control and Prevention, Atlanta, Estados Unidos da América, sob a orientação direta dos pesquisadores Dr Gregory A. Dash e Marina E. Ereemeeva e constaram do treinamento realizado por mim de janeiro a março de 2007.

Para identificação de RGFM foram utilizados os *primers* Rr17-122 e Rr17-500 e internos TZ15 e TZ16 (**Tabela 3**) (fabricado por: *Integrated DNA Technologies, Inc, Coralville, IA, USA*), os quais amplificam um fragmento de 402pb e 246pb respectivamente do gene que codifica o antígeno de membrana principal 17kDa (Tzianabos *et al.*, 1989). O volume final de reação foi de 25 μ L. Na primeira reação, pipetou-se o tampão da PCR 2X (Master Mix *ready-to use*, Fermentas, Life Sciences -California, USA, contendo 0,05 U/ μ L de *Taq* DNA polimerase em 4mM de $MgCl_2$ e 0,4 mM de cada deoxinucleotídeo – dNTPs), 0,4 μ M de cada *primer* (Rr17-122 e Rr17-500), e 2 μ L do DNA , acertando-se o volume final com água MilliQ estéril. A primeira reação de amplificação foi realizada no Termociclador *PxE Thermal Cyclor – ThermoHybaid, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*, com programa de: incubação inicial de 95°C por 5 min, 40 ciclos de 40s a 95°C, 40s a 55°C e 1 min a 72°C, e extensão final de 5 min a 72°C. Os *primers* Rr17-122 e Rr17-500 correspondem aos resíduos 67-89 e 448-469 da sequência DQ926852.1(*BLAST*), do gene do antígeno de superfície 17kDa de *Rickettsia prowazekii* e foram desenhados para detectar RGFM e do Grupo Tifo (GT) (Blair *et al.*, 2004).

Para a segunda reação, pipetou-se o tampão Master Mix 5X, 0,4 μ M de concentração final de cada iniciador (TZ15 e TZ16), e 4 μ L do produto do primeiro PCR , acertando-se o volume final com água MilliQ estéril. A segunda reação de amplificação foi realizada com programa de: incubação inicial de 95°C por 5 min, 30 ciclos de 40s a 95°C, 40s a 55°C e 1 min a 72°C, e extensão final de 5 min a 72°C. Os *primers* TZ15 e TZ16 correspondem aos resíduos 82-101 e 309-328 da sequência AB516961.1 e foram desenhados para detectar exclusivamente riquetsias do GFM.

Os produtos da amplificação foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), utilizando tampão TAE 1X (pH 8.0; 40 mmol/L Tris-acetato, 1 mmol/L EDTA). A visualização do gel e a documentação foram efetuadas no programa LabWorks, com um sistema de captura de imagens (*Image Acquisition and analysis software*) da UVP, Inc CA, USA.

Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para *Nested PCR*.

Aplicação	Nome do Primer	Gene Alvo	Sequência de nucleotídeo (5'-3')	Tamanho do produto amplificado (bp)
Identificação de <i>Rickettsia spp</i>	R17-122	17-kDa (<i>htrA</i>)	CAGAGTGCTATGAACAAACAAGG	402
	R17-500		CTTGCCATTGCCCATCAGGTTG	
Identificação de <i>Rickettsia</i> GFM	TZ 15		TTCTCAATTCGGTAAGGGC	246
	TZ 16		ATATTGACCAGTGCTATTTC	

O produto amplificado no segundo PCR foi purificado utilizando o sistema *Wizard PCR Preps* (Promega, Madison, WI) e ambas as fitas de DNA sequenciadas (3'-5' e 5'-3') utilizando-se o Kit *Big Dye Terminator Sequence* (Hall, T.A 1999) de acordo com o protocolo do fabricante. Os sequenciamentos foram realizados utilizando o sequenciador automático ABI Prism 377 (Perkin-Elmer Applied Biosystems). As sequências obtidas foram editadas manualmente com auxílio do programa *Chromas Lite* 2.01 (Technelysium Pty Ltd, AU) e *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Tom Hall Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA) (Hall, T.A. 1999) e alinhadas através do programa MEGALIGN (DNASTAR, Inc. Madison, Wis. USA) com sequências correspondentes as riquetsias do GFM depositadas nos bancos genômicos (GenBank) para confirmação do resultado pelo grau de similaridade (Tzianabos *et al.*, 1989 ; Blair *et al.*, 2004a e b; Ereemeeva 2006a e b; Wikswo *et al.*, 2007).

6.2.6. Diagnóstico Molecular – Controle de Qualidade

Para evitar contaminação cruzada, os procedimentos foram realizados seguindo as boas práticas de laboratório recomendadas para diagnóstico molecular (Kwok *et al.*, 1989), em três ambientes isolados com equipamentos e reagentes exclusivos, a saber: um para extração de DNA das amostras e adição do 1º *template*; um livre de DNA, para preparo dos reagentes para reação de PCR; e um para atividades pós PCR como: aplicação da amostra na reação de *Nested* (fluxo exclusivo), identificação dos produtos da PCR e purificação dos produtos para o sequenciamento.

Durante todo o procedimento, foram utilizadas ponteiros com filtro resistente a aerossóis (Axigen Scientific. Inc., Union City, CA, USA), aventais exclusivos para cada sala, luvas de procedimento sem talco. A recomendação para utilização dos ambientes em fluxo unidirecional foi respeitada como: preparo das amostras, preparo de reagentes e análise dos produtos.

Os tubos com produtos pós-amplificação foram centrifugados antes de serem abertos na área exclusiva para análise de produtos e foram abertos com auxílio de gaze exclusiva para cada tubo.

Previamente a análise das amostras, o controle positivo (isolado em cultura celular) foi utilizado para validação das reações. Uma vez validada a metodologia, o controle positivo (isolado de um coágulo sanguíneo 1413-04) foi diluído seriadamente sendo utilizado durante as reações a alíquota de menor concentração detectada.

Foram utilizados controles de reagentes (sem *template*) para avaliação e controle de qualidade das salas utilizadas, incluindo a sala de aplicação do *Nested* PCR.

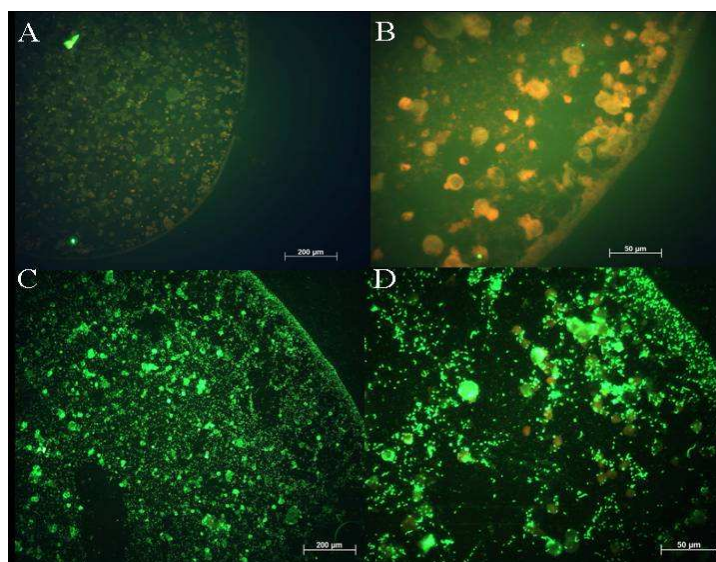
7. RESULTADOS

7.1. Pesquisa de Anticorpos contra FM

Entre as amostras selecionadas para o estudo foram identificadas três amostras de soro positivas para FM, com IgG e IgM ≥ 128 (amostras 3, 9 e 44) e 1 com resultado IgG negativo (<64) e com IgM $=128$ (amostra 7), a qual foi considerada como positiva neste estudo, porém com uma ressalva da possibilidade de se tratar de reação cruzada inespecífica.

As 46 amostras restantes foram negativas. A amostra 46 teve como resultado IgG <64 e IgM $=64$ e foi considerada como negativa de acordo com o critério adotado neste estudo (casos positivos IgG e/ou IgM >64) (**Apêndice 2**)

Figura 6 – Detecção de anticorpos contra riquetsias do GFM em amostras de soro de paciente com suspeita clínica da doença e identificação pela RIFI



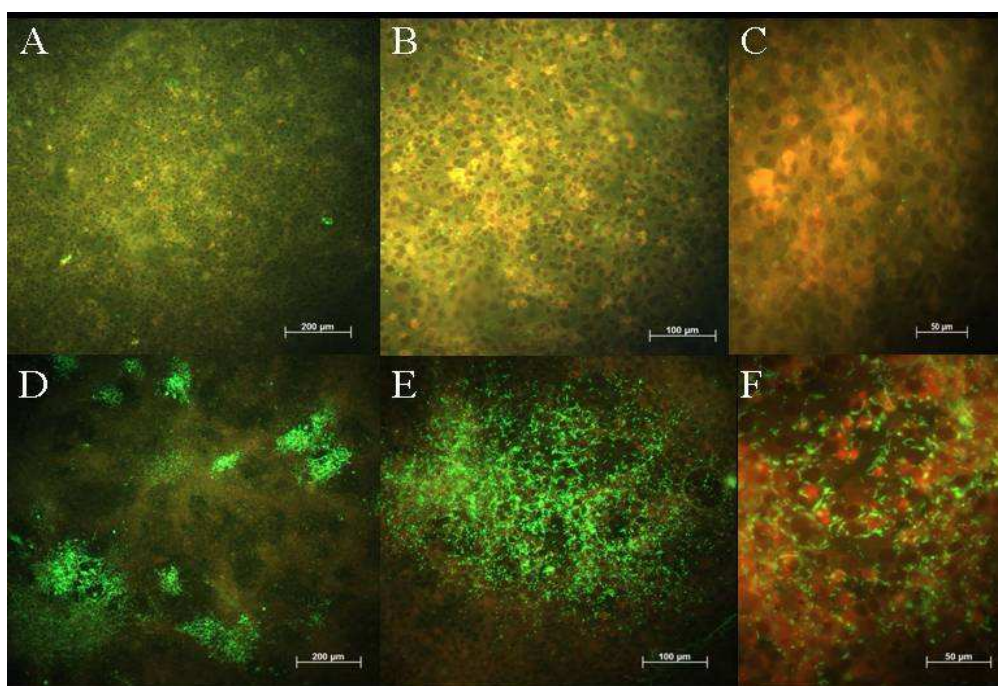
Em A - controle negativo, IgG (10X); B- controle negativo (40X); C- controle positivo, IgG (10X); D- controle positivo (40X) Fonte: Santos F C P *et al.* Fotomicroscópio Zeiss, modelo Axioskop 2 plus, Fotografado por Dra Jussara Bianchi Castelli do Laboratório de Patologia do InCor-HCFMUSP.

7.2. Isolamento de Riquétsias do GFM

Entre os 50 casos estudados, 14 (28%) tiveram amostras processadas para o isolamento de riquetsias em cultura celular.

Das amostras selecionadas para este estudo 8 (57%) foram positivas no teste de isolamento bacteriano (**Apêndice 2**).

Figura 7 – Detecção de riquetsias do Grupo da FMB através do isolamento em cultura de células Vero e identificação por RIFI. Isolamento em cultura celular (Vero) identificação por Imunofluorescência Indireta para RGFM



Em A controle negativo (10x); B- controle negativo (20x); C- controle negativo (40x); D- isolamento positivo (10x); E- isolamento positivo (20x); F- isolamento positivo (40x); Fonte: Santos F C P *et al.*, Fotomicroscópio Zeiss, modelo Axioskop 2 plus, Fotografado por Dra Jussara Bianchi Castelli do Laboratório de Patologia do InCor-HCFMUSP.

7.3. Detecção específica de Riquetsias do GFM - Validação da reação

Na figura 8 estão ilustrados os resultados das PCRs, avaliando-se diluições seriadas do controle positivo. Na parte superior do gel A estão demonstrados os produtos obtidos na amplificação utilizando-se os iniciadores externos (Rr17-122 e Rr17-500) e na parte inferior os iniciadores internos (TZ15 e TZ16), os quais originam fragmentos de 402 e 246 pb, respectivamente.

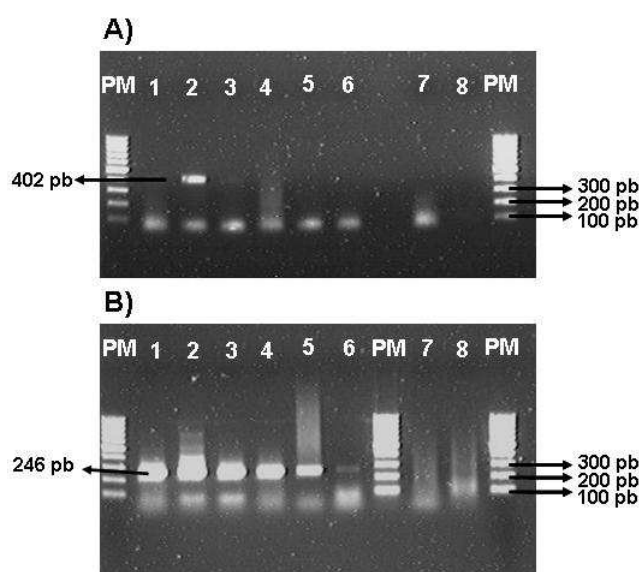


Figura 8. Análise eletroforética dos produtos amplificados em diluição seriada do controle positivo (isolado 1413-04). Gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídio, em A primeiro PCR (Rr17-122 e Rr17-500), em B segundo PCR (NESTED), nas Linhas 1: controle positivo diluído em água 1:100; 2: diluição 1:200; 3: diluição 1:300; 4: diluição 1:400; 5: diluição 1:800; 6: diluição 1:1000; 7 e 8: controles negativos (reagentes), PM: corresponde ao padrão de pares de base de DNA de 100 pb.

De acordo com os resultados obtidos, a diluição escolhida para ser utilizada como controle positivo durante a análise das amostras foi de 1:800, caracterizando-se como a maior diluição do controle que apresentou sinal positivo inquestionável.

7.4. Detecção específica de Riquetsias do GFM - Análises das amostras

Na figura 9 estão ilustrados os resultados das PCRs das 10 primeiras amostras analisadas. Pode-se observar que na primeira PCR, não foi possível detectar o produto amplificado em nenhuma amostra analisada, já na reação *Nested* (2º PCR) 6 amostras tiveram gene do 17kDa de riquetsias do GFM amplificado detectado (3,7 e 9).

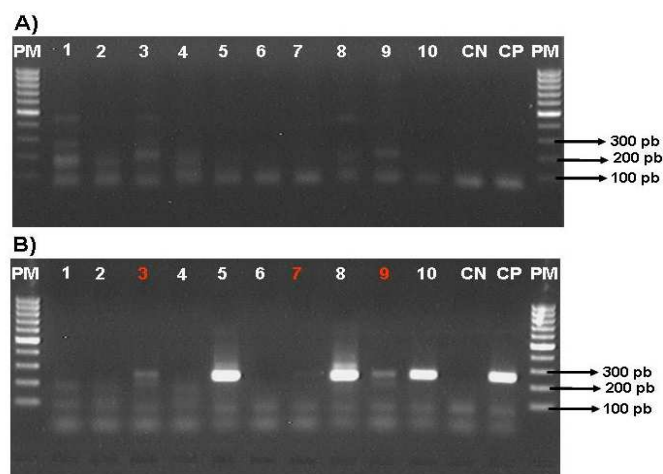


Figura 9. Análise eletroforética dos produtos amplificados em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio, em A primeiro PCR (Rr17-122 e Rr17-500), em B segundo PCR (NESTED), nas Linhas **1:** produto obtido da amplificação do DNA extraído de soro do paciente 1; **2:** paciente 2; **3:** paciente 3; **4:** paciente 4; **5:** paciente 5; **6:** paciente 6; **7:** paciente 7; **8:** paciente 8; **9:** paciente 9; **10:** paciente 10; **CN:** controles negativos (reagentes), **CP:** controles positivos (isolado 1413-04 na diluição 1:800) **PM:** corresponde ao padrão de pares de base de DNA de 100 pb. *As amostras em vermelho foram repetidas no item 7.5.

A análise das amostras de 11 a 20, mostram que 2 amostras foram positivas já na primeira reação. As amostras 11 e 15 foram repetidas no item 7.5, pois os coágulos correspondentes a estes casos indicaram isolamento bacteriano positivo. A amostra nº 20 foi repetida para confirmar que não houve contaminação durante a aplicação no gel de eletroforese.

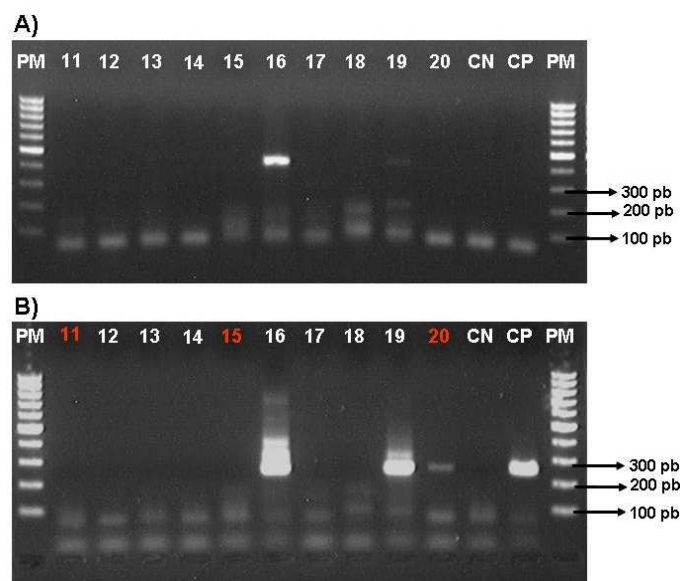


Figura 10. Análise eletroforética dos produtos amplificados em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio, em A primeiro PCR (Rr17-122 e Rr17-500), em B segundo PCR (NESTED), nas Linhas **1**: produto obtido da amplificação do DNA extraído de soro do paciente 11; **2**: paciente 12; **3**: paciente 13, **4**: paciente 14; **5**: paciente 15; **6**: paciente 16; **7**: paciente 17; **8**: paciente 18; **9**: paciente 19; **10**: paciente 20; **CN**: controles negativos (reagentes), **CP**: controles positivos (isolado 1413-04 na diluição 1:800) **PM**: corresponde ao padrão de pares de base de DNA de 100 pb. *As amostras em vermelho foram repetidas no item 7.5.

Na análise das amostras de 21 a 30 observa-se que novamente não houve casos positivos na primeira reação, porém pode-se observar o fragmento de 247 pb nas amostras 21, 24, 25, 26, 28 e 29. As amostras em vermelho foram repetidas no item 7.5, para confirmação do resultado devido ao fraco sinal após a reação (**Figura 11**).

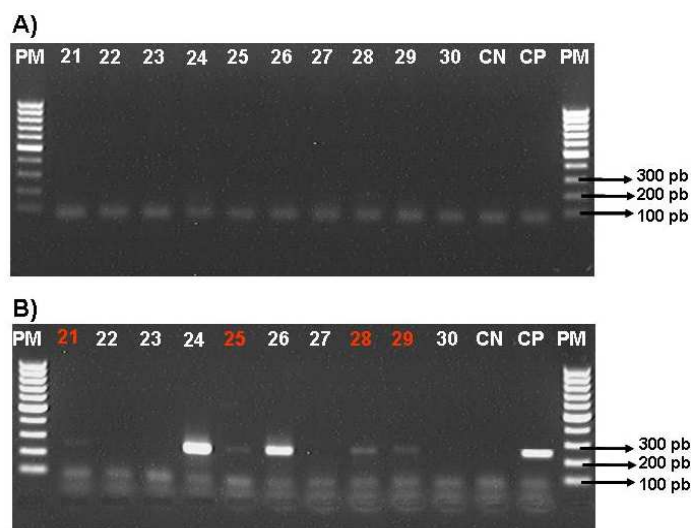


Figura 11. Análise eletroforética dos produtos amplificados em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio, em A primeiro PCR (Rr17-122 e Rr17-500), em B segundo PCR (NESTED), nas Linhas **1**: produto obtido da amplificação do DNA extraído de soro do paciente 21; **2**: paciente 22; **3**: paciente 23; **4**: paciente 24; **5**: paciente 25; **6**: paciente 26; **7**: paciente 27; **8**: paciente 28; **9**: paciente 29; **10**: paciente 30; **CN**: controles negativos (reagentes), **CP**: controles positivos (isolado 1413-04 na diluição 1:800) **PM**: corresponde ao padrão de pares de base de DNA de 100 pb. *As amostras em vermelho foram repetidas no item 7.5.

A figura 12 mostra a análise das amostras de 31 a 40. Observa-se que 2 amostras foram fracamente positivas na 1ª PCR (32 e 38) as quais foram confirmadas na 2ª reação. As amostras 34 e 36 foram repetidas para confirmação do resultado no Item 7.5.

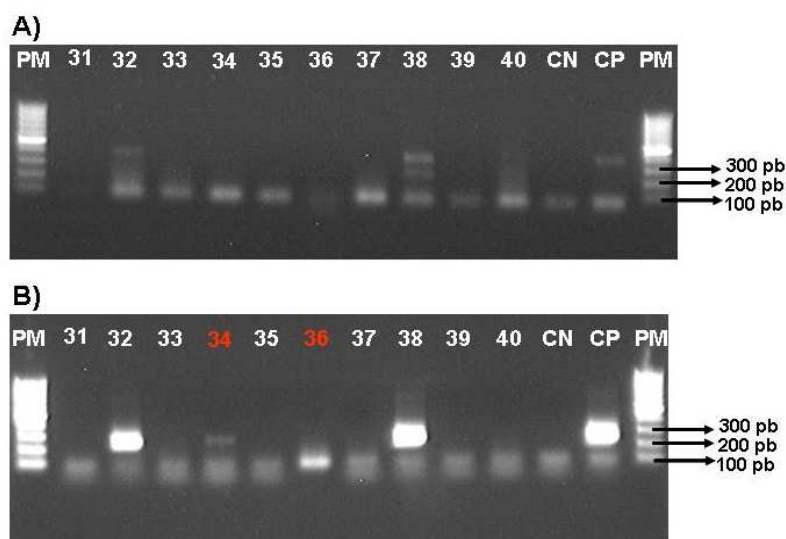


Figura 12. Análise eletroforética dos produtos amplificados em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio, em A primeiro PCR (Rr17-122 e Rr17-500), em B segundo PCR (NESTED), nas Linhas **1**: produto obtido da amplificação do DNA extraído de soro do paciente 31; **2**: paciente 32; **3**: paciente 33; **4**: paciente 34; **5**: paciente 35; **6**: paciente 36; **7**: paciente 37; **8**: paciente 38; **9**: paciente 39; **10**: paciente 40; **CN**: controles negativos (reagentes), **CP**: controles positivos (isolado 1413-04 na diluição 1:800) **PM**: corresponde ao padrão de pares de base de DNA de 100 pb. *As amostras em vermelho foram repetidas no item 7.5.

Na figura 13 pode ser observado o resultado da análise das amostras 41 a 50. Não houve amplificação na primeira reação, porém na segunda reação os casos 42 e 50 foram confirmados e os números de amostras que estão em vermelho foram repeditos para confirmação do resultado.

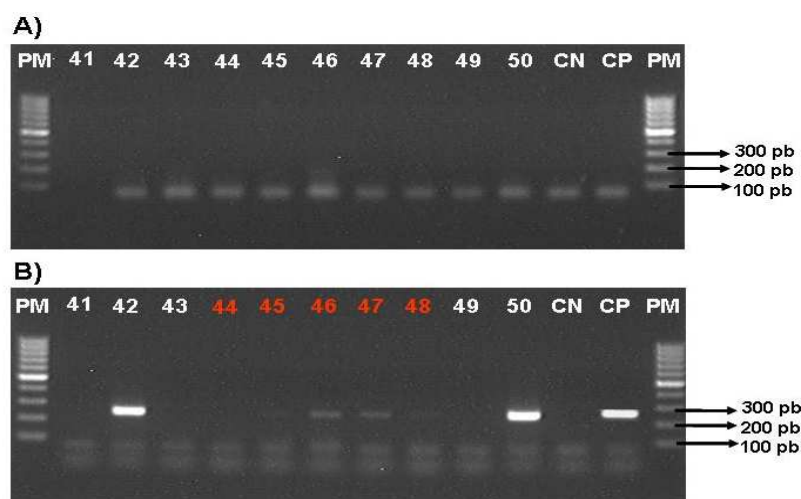


Figura 13. Análise eletroforética dos produtos amplificados em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio, em A primeiro PCR (Rr17-122 e Rr17-500), em B segundo PCR (NESTED), nas Linhas **1**: produto obtido da amplificação do DNA extraído de soro do paciente **41**; **2**: paciente 42; **3**: paciente 43; **4**: paciente 44; **5**: paciente 45; **6**: paciente 46; **7**: paciente 47; **8**: paciente 48; **9**: paciente 49; **10**: paciente 50; **CN**: controles negativos (reagentes), **CP**: controles positivos (isolado 1413-04 na diluição 1:800) **PM**: corresponde ao padrão de pares de base de DNA de 100 pb. *As amostras em vermelho foram repetidas no item 7.5.

7.5. Detecção específica de Riquetsias GFM – Amostras repetidas

As amostras marcadas em vermelho nas figuras dos géis de eletroforese foram selecionadas para serem repetidas e seguiram os seguintes critérios: amostras negativas ou fracamente positivas na *Nested* PCR, com resultado positivo pelos métodos IFI e/ou isolamento bacteriano; amostras fracamente positiva na *Nested* PCR com ou sem presença de bandas eletroforéticas inespecíficas.

A primeira repetição foi realizada seguindo as condições iniciais. Não havendo melhoria significativa (dados não apresentados), foram feitas algumas alterações no protocolo na tentativa de melhorar o sinal positivo no gel.

A proposta de aumentar a quantidade de *template*, passando de 2 para 4 µL na 1ª reação e de 4 para 6 µL na reação *Nested* mostrou-se eficiente nos casos 36, 45 e 47, mas não esclareceu os outros casos (**Figura 14**)

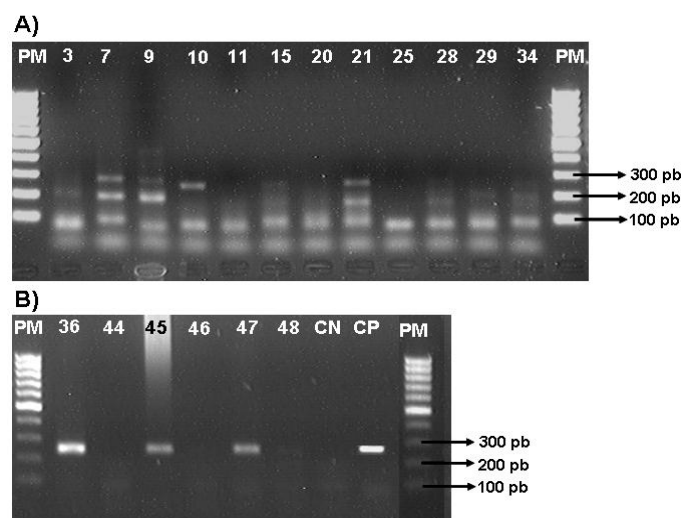


Figura 14. Análise eletroforética dos produtos amplificados em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio do segundo PCR (Nested). Repetição dos casos sugestivos positivos com utilização de 4 µL de DNA no primeiro PCR (Rr17-122 e Rr17-500) e 6µL do 1º PCR no segundo PCR (NESTED), em **A**, nas Linhas **1**: produto obtido da amplificação do DNA extraído de soro do paciente 3; **2**: paciente 7; **3**: paciente 9; **4**: paciente 10; **5**: paciente 11; **6**: paciente 15; **7**: paciente 20; **8**: paciente 21; **9**: paciente 25; **10**: paciente 28; **10**: paciente 29; **10**: paciente 34, em **B**, nas Linhas **1**: paciente 36; **2**: paciente 44; **3**: paciente 45; **4**: paciente 46; **5**: paciente 47; **6**: paciente 48 **CN**: controle negativo (reagentes), **CP**: controle positivo (isolado 1413-04 na diluição 1:800) **PM**: corresponde ao padrão de pares de base de DNA de 100 pb.

A segunda proposta foi de aumentar a quantidade de *template*, passando para 6 μ L na 1ª reação, mas manter 4 μ L na reação *Nested*. Essa modificação melhorou o sinal positivo das amostras 45 e 48, não alterou o 46, e nos outros casos não houve esclarecimento (**Figura 15**).

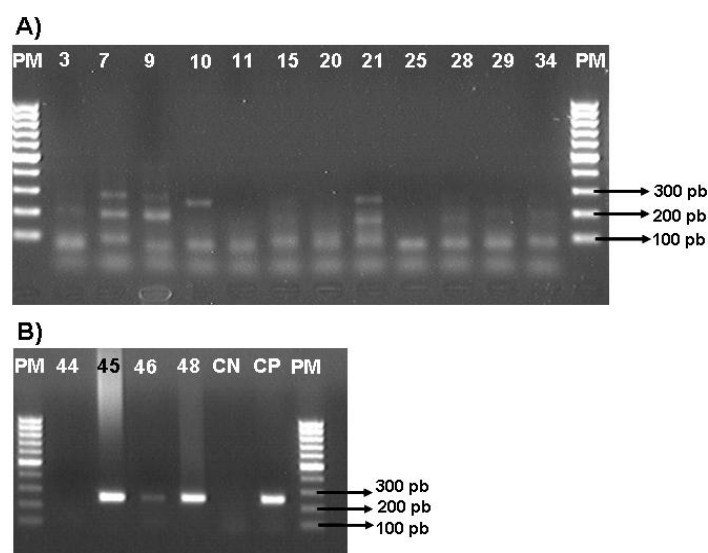


Figura 15 Análise eletroforética dos produtos amplificados em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio do segundo PCR (Nested). Repetição dos casos sugestivos positivos com utilização de 6 μ L de DNA no primeiro PCR (Rr17-122 e Rr17-500) e 4 μ L do 1º PCR no segundo PCR (NESTED), em A, nas Linhas 1: produto obtido da amplificação do DNA extraído de soro do paciente 3; 2: paciente 7; 3: paciente 9; 4: paciente 10; 5: paciente 11; 6: paciente 15; 7: paciente 20; 8: paciente 21; 9: paciente 25; 10: paciente 28; 10: paciente 29; 10: paciente 34, em B, nas Linhas 1: paciente 44; 2: paciente 45; 3: paciente 46; 4: paciente 48; CN: controle negativo (reagentes), CP: controle positivo (isolado 1413-04 na diluição 1:800) PM: corresponde ao padrão de pares de base de DNA de 100 pb.

7.6. Sequenciamento dos fragmentos amplificados

As amostras que apresentaram fragmento amplificado do tamanho esperado pelo desenho dos *primers* TZ15 e TZ16 foram encaminhadas para o sequenciamento automático. As sequências geradas foram editadas e alinhadas entre si, tendo como referência a sequência da *Rickettsia rickettsii*, cepa Sheila Smith (CP000848-1). O resultado após as análises mostrou similaridade de 100% com o gene da proteína de membrana 17kDa de riquetsias do GFM em todas as sequências. O **Apêndice 3** mostra as sequências obtidas das amostras (#SAMP), o alinhamento entre elas e a similaridade com a *R. rickettsii* cepa Sheila Smith.

7.7. Análise comparativa das metodologias sorológicas e moleculares

No teste da *Nested* PCR o fragmento específico de riquetsias GFM foi detectado em 40% (20/50) dos soros testados em comparação com 22% (11/50) detectados pelos métodos tradicionais (sorologia IFI e isolamento bacteriano) (**Figura 16**) **Apêndice 2**.

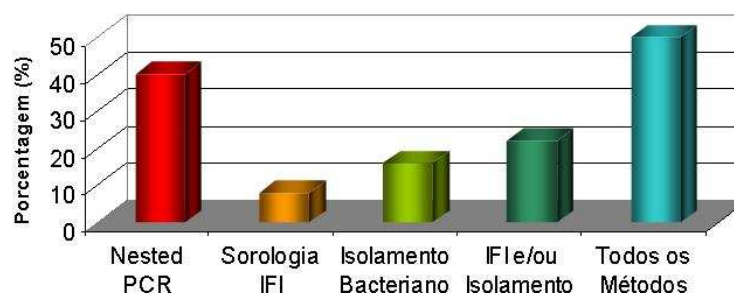


Figura 16. Porcentagem de casos positivos detectados com diferentes metodologias de diagnóstico para Febre Maculosa: *Nested* PCR; Sorologia (IFI), Isolamento Bacteriano; IFI e/ou isolamento bacteriano; e a soma de todos os métodos.

Em relação a metodologia sorológica, observamos na **Tabela 4** que dos 4 casos com sorologia positiva pela IFI, nenhum foi detectado pela *Nested* PCR.

Tabela 4. Comparação entre os resultados obtidos pelos métodos: sorologia (IFI) e a *Nested* PCR.

		<i>Nested</i> PCR		
		(+)	(-)	Total
IFI	(+)	0	4	4
	(-)	20	26	46
Total		20	30	50

* Os números se referem ao número de amostras analisadas.

Dos casos em que o material foi enviado para isolamento 57% (8/14) foram positivos (**Tabela 5**), sendo que destes, apenas 1 caso (13% ou 1/8) foi positivo também na sorologia (**Apêndice 2**). Entre os casos negativos no isolamento 50% (3/6) foram confirmados como positivos através da *Nested* PCR.

Tabela 5. Comparação entre os resultados obtidos pelos métodos: isolamento bacteriano em cultura de células e a *Nested* PCR.

		<i>Nested</i> PCR		
		(+)	(-)	Total
Isolamento (n=14)	(+)	6	2	8
	(-)	3	3	6
Total		9	5	14

* Os números se referem ao número de amostras analisadas.

Na **Tabela 6** dos 11 casos positivos pela sorologia (IFI) e/ou isolamento bacteriano, a *Nested PCR* mostrou resultados concordantes em 6 deles (55%). Observa-se também que dos 39 casos restantes com suspeita clínica de FMB com sorologia negativa e/ou isolamento negativo (quando realizado), 14 foram confirmados (36%).

Tabela 6. Comparação entre os resultados obtidos pelos métodos atualmente utilizados na rotina: sorologia (IFI) e isolamento bacteriano em cultura de células e a *Nested PCR*.

		<i>Nested PCR</i>		
		(+)	(-)	Total
<i>IFI e/ou Isolamento</i>	(+)	6	5	11
	(-)	14	25	39
<i>Total</i>		20	30	50

* Os números se referem ao número de amostras analisadas.

A tabela 6 mostra a comparação entre os resultados obtidos pelos métodos tradicionais (sorologia e isolamento) em relação à *Nested PCR* mostrou aumento na sensibilidade para o diagnóstico da FMB de 22% (11/50) para 40% (20/50), quando utilizado como metodologia complementar as de rotina.

8. DISCUSSÃO

No Laboratório de Riquetsias do IAL, os testes sorológicos (pesquisa de anticorpos no soro) constituem a principal ferramenta diagnóstica para FM, correspondendo a cerca de 80% das atividades de rotina do laboratório, porém muitas falhas no diagnóstico têm sido observadas nos casos de óbito. A experiência mostra que nos casos de óbito devido a FM, em pelo menos 60% dos casos o diagnóstico foi confirmado pelo isolamento, com sorologia negativa (amostra única em fase aguda), e cerca de 40% pela sorologia e/ou critério clínico epidemiológico. Aproximadamente dois terços dos pacientes não apresentam sorologia positiva na fase aguda da doença (Font-Creus *et al.*, 1985).

Embora o resultado do isolamento seja conclusivo, quando positivo, o resultado negativo tem baixo valor diagnóstico, pois uma série de fatores pode interferir no processo resultando em um resultado negativo, como o uso de antibiótico antes da coleta, as condições de esterilidade da coleta, armazenamento e transporte das amostras de maneira inadequada.

O objetivo principal deste estudo foi testar uma metodologia complementar para diagnóstico de casos fatais suspeitos de FMB em busca de diminuir o número de casos graves falsos negativos. Trata-se de um trabalho de grande importância e impacto para a vigilância desta doença.

O melhoramento do diagnóstico de casos graves de FMB é de fundamental importância uma vez que os sintomas clínicos, bem como a evolução da doença são definidos por pelo menos três fatores: a capacidade imunológica individual do paciente; a virulência do agente; o intervalo entre o início dos sintomas e o início da terapia específica.

As novas metodologias moleculares podem trazer benefícios com relação à identificação do agente e sua caracterização. Atualmente, pouco se sabe sobre o agente causador da FMB. Os métodos clássicos (sorologia e isolamento) permitem a identificação apenas do GFM e não definem a ou as espécies envolvida(s). As pesquisas realizadas no Brasil, através de

metodologias moleculares mostraram que na maioria dos casos graves o agente é a *R. rickettsii*, exceto um caso não autóctone confirmado como *R. conorii*. (Nascimento *et al.*, 2005; Gerkhe *et al.*, 2006). Atualmente alguns trabalhos sugerem a existência de variações intergênicas (VIR) entre diferentes isolados de *R. rickettsii* possivelmente associadas à virulência (Eremeeva *et al.*, 2006a; Karpathy *et al.*, 2007) mostrando a importância não apenas da identificação, mas também da caracterização do agente para melhor entendimento da doença.

Sabe-se que o diagnóstico laboratorial da FMB hoje é de utilização prioritariamente epidemiológica, pois na maioria dos casos o resultado é obtido no período de convalescença, ou após a ocorrência do óbito. Existe a possibilidade de que a utilização racional das metodologias moleculares possa agilizar a obtenção do resultado podendo ser de utilidade para o clínico durante o acompanhamento do paciente.

O uso racional das metodologias moleculares para o diagnóstico da FMB abrange aspectos externos e internos ao laboratório. Dos aspectos externos podemos citar os critérios de seleção dos casos indicados, uma vez que o diagnóstico etiológico é de aplicação para casos graves na fase aguda da doença, já com relação aos aspectos internos ao laboratório podemos citar o cuidado com contaminações e a preocupação permanente com a fidedignidade do resultado através da garantia da qualidade no processo de análise e interpretação do resultado.

A metodologia *Nested* PCR utilizada foi desenhada para amplificar uma região gênica específica de riquetsias do GFM (antígeno de superfície 17kDa) e foi aplicada ao diagnóstico em amostras de soro. Essa mesma metodologia é utilizada pelo CDC e por outros grupos de pesquisadores como método de triagem para detecção de riquetsias GFM, com aplicações principalmente na vigilância ambiental das riquetsioses, em vetores e hospedeiros (Eremeeva *et al.*, 2006a; Blair *et al.*, 2004a; Labruna *et al.*, 2004; Wikswo *et al.*, 2007). Este método atualmente vem sendo utilizado conjuntamente com novos métodos

cuja sensibilidade é ainda maior e o processamento simplificado e seguro como PCR em tempo real (Eremeeva *et al.*, 2006 a e b; Labruna *et al.*, 2004).

Em 1989, Tzianabos *et al.* detectou RGFM em amostras clínicas humanas (coágulo sanguíneo) utilizando apenas os primers TZ-15 e TZ-16 em PCR simples e obteve resultados bastante interessantes: dos nove (9) casos confirmados pela PCR, sete (7) 78% eram provenientes de casos graves que evoluíram para óbito.

As RGFM são intracelulares obrigatórias com tropismo para células endoteliais, portanto as amostras clínicas de eleição para o diagnóstico etiológico molecular são: biópsia de pele, coágulo sanguíneo ou sangue total, porém a maior parte das amostras biológicas enviadas ao laboratório para diagnóstico de FMB trata-se de soro, mesmo em casos de óbito.

Nos casos graves, é sugestivo que as riquetsias encontram-se livres ou fragmentos de DNA devido à lesão celular provocada pela intensa riquetsemia o que colaboraria para a sua detecção no soro. Além disso, a utilização de métodos mais sensíveis como *Nested* PCR possibilitam um aumento de 100 vezes na sensibilidade em relação à PCR simples, chegando a detectar até 7 cópias por ensaio (Choi *et al.*, 2005).

Outros protocolos para *Nested* PCR já foram utilizados em amostras de soro com resultados positivos, principalmente quando utilizados em amostras de pacientes com quadro grave da doença ou casos fatais (Leitner *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2005).

No presente trabalho, dos 20 casos positivos (20/50) apenas 4 casos foram detectados na primeira reação indicando que realmente o soro é uma amostra que possui baixa quantidade de bactérias sendo, portanto, torna-se necessária a aplicação de métodos mais sensíveis do que o PCR convencional.

Em relação aos 5 casos que foram positivos pelas metodologias clássicas (3 pela sorologia e 2 pelo isolamento bacteriano) e negativos pela *Nested* PCR, podemos levantar algumas hipóteses, como: existência de interferentes (inibidores), qualidade da amostra clínica devido a condições de

coleta, armazenamento e transporte inadequados. Em nosso estudo, verificamos que as alterações de protocolo com relação à quantidade de *template* foram bem sucedidas em alguns casos, mas em outros permaneceram inconclusivos ou negativos. Variações no protocolo precisam ser estudadas para que protocolos alternativos sejam aplicados em casos com resultado duvidosos, incluindo re-extrações e utilização de técnicas mais sensíveis como Real time PCR (RT PCR).

Observamos também a grande importância do isolamento bacteriano nos casos fatais estudados em relação à sorologia uma vez que 57% (8/14) puderam ser identificados como positivos pelo isolamento, enquanto que pela sorologia apenas 8% (4/50) foram detectados. Considerando apenas os casos com resultado de isolamento, a utilização concomitante da *Nested PCR* permitiu a detecção de mais 3 casos, ou seja passou para 79% (11/14) de positivos detectados. Estes resultados mostram que a metodologia molecular aplicada neste estudo, em amostras de soro, melhora a sensibilidade na detecção de casos de FMB, porém não substitui completamente a necessidade do isolamento bacteriano, sendo útil como método complementar.

De modo geral, os resultados obtidos indicam que a metodologia utilizada aumentou a sensibilidade do diagnóstico da FMB de 22% (11/50) para 40% (20/50), ou seja, 14 (14/50) casos graves de FMB foram detectados exclusivamente pela metodologia molecular.

Com esses resultados podemos dizer que a *Nested PCR* baseada na sequência 17-kDa em soro pode ser útil para o diagnóstico de riquetsioses do GFM, em casos fatais, com suspeita clínica da doença, principalmente quando a sorologia (IFI) for negativa, cujo coágulo ou biópsia de pele não puderam ser enviados para o isolamento da bactéria em cultura de células.

9. CONCLUSÃO

A *Nested* PCR baseada na sequência do gene 17-kDa em amostras de soro é útil para o diagnóstico de riquetsioses do GFM em casos fatais, com suspeita clínica da doença, principalmente quando utilizada como metodologia complementar à sorologia e isolamento bacteriano.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson BE, Tzianabos T. Comparative sequence analysis of a genus-common rickettsial antigen gene. J Bacteriol 1989 Sep;171(9):5199-201.

Angerami RN, Nunes EM, Nascimento EMM, Ribas Freitas A, Kemp B, Feltrin AFC, Pacola MR, Perecin GEC, Sinkoc V, Ribeiro Resende M, Katz G, Silva LJ. Clusters of Brazilian spotted fever, southeastern Brazil. A review of official reports and the scientific literature (DOI: 101111/j.149-0691.2008.02637) <http://www.interscience.wiley.com/journal/123215849/issue>

Angerami RN, Silva AMR, Nascimento EMM, Colombo S, Wada MY, Santos FCP, Mancini DM, Oliveira RC, Katz G, Martins EC, Silva LJ. Brazilian spotted fever: two faces of a same disease? A comparative study of clinical aspects between an old and a new endemic area in Brazil. (DOI: 101111/j.149-0691.2008.02160) <http://www.interscience.wiley.com/journal/123215849/issue>

Blair PJ, Jiang J, Schoeler GB, Moron C, Anaya E, Cespedes M et al. Characterization of spotted fever group rickettsiae in flea and tick specimens from northern Peru. J Clin Microbiol 2004 Nov ; 42(11):4961-7.

Blair PJ, Schoeler GB, Moron C, Anaya E, Caceda R, Cespedes M, et al. Evidence of rickettsial and leptospira infections in Andean northern Peru. Am J Trop Med Hyg 2004 Apr; 70(4):357-63.

Branchini MLM et al. Relato de um foco endêmico de riquetsiose. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 24. Manaus. Anais: Manaus; Instituto de Medicina Tropical 1998. (Resumo 2).

- Brezina R. Diagnosis and control of rickettsial diseases Acta Virol 1985 Jul; 29(4):338-49. Review.
- Calic, SB. Perfil epidemiológico da febre maculosa brasileira e outras riquetsioses em Minas Gerais, 1995 a 2002. Belo Horizonte (MG): Escola de Veterinária da UFMG, 2006.
- Choi YJ, Lee SH, Park KH, Koh YS, Lee KH, Baik HS et al. Evaluation of PCR-based assay for diagnosis of spotted fever group rickettsiosis in human serum samples. Clin and Diagn Lab Imm 2005 Jun ; 12(6):759-63.
- Dias E, Martins A V. Spotted fever in Brazil. Am J Trop Med 1939;19 (2): 103-08.
- Eremeeva M, Yu X, Raoult D. Differentiation among spotted fever group rickettsiae species by analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA. J Clin Microbiol 1994 Mar ; 32(3):803-10.
- Eremeeva ME, Bosserman A, Zambrano ML, Demma LJ, Dasch GA. Molecular typing of *Rickettsia rickettsii* strains isolates from Arizona. Ann N Y Acad.Sci 2006a;1078:573-77.
- Eremeeva ME, Bosserman EA, Demma LJ, Zambrano ML, Blau DM, Dasch GA. Isolation and identification of *Rickettsia massiliae* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks collected in Arizona. Appl Environ Microbiol. 2006b Aug; 72(8):5569-77.
- Fishbein DB, Kaplan JE, Bernard KW, Winkler WG Surveillance of Rocky Mountain spotted fever in the United States, 1981-1983. J Infect Dis 1984 Oct; 150(4):609-11.

Font-Creus B, Bella-Cueto F, Espejo-Arenas E, Vidal-Sanahuja R, Muñoz-Espin T, Nolla-Salas M et al. Mediterranean spotted fever: a cooperative study of 227 cases. *Rev Infect Dis* 1985 Sep-Oct; 7(5):635-42.

Galvão MAM. A Febre Maculosa Brasileira em Minas Gerais e seus determinantes. [Dissertação] Rio de Janeiro (RJ) Escola Nacional de Saúde Pública, 1988.

Galvão MA, Silva LJ, Nascimento EMM, Calic SB, Sousa R, Bacellar F. Rickettsial diseases in Brazil and Portugal: occurrence, distribution and diagnosis. *Rev Saude Publica* 2005 Oct; 39(5):850-6. Epub 2005 Oct 24.

Gehrke FS, Mendes do Nascimento EM, Rodrigues de Souza E, Colombo S, Jacintho da Silva L, Schumaker TT. Detection of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia* sp. in blood clots in 24 patients from different municipalities of the State of Sao Paulo, Brazil. *Ann N Y Acad Sci* 2006 Oct; 1078:260-2

Gonçalves AJR, Lopes PFA, Melo JPC, Pereira AA, Pinto AMM, Lazera MS, Souza MLS, Teixeira CRU, Oliveira JC, Duarte F. Rickettsioses – a propósito de quatro casos diagnosticados no Rio de Janeiro de febre maculosa brasileira. *F Méd (BR)* 1981; 82(2):127-34.

Greene CE. Rocky Mountain spotted fever. *J Am Vet Med Assoc* 1987 Sep; 151(6):666-71.

Hall TA. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999; 41:95-8.

- Horta MC, Labruna MB, Sangioni LA, Vianna, MC, Gennari, SM, Galvao MA, 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*. Am J Trop Med Hyg 2004 Jul; 71(1):93-7.
- Horta MC. Natural infection, transovarial transmission, and transstadial survival of *Rickettsia bellii* in the tick *Ixodes loricatus* (Acari: Ixodidae) from Brazil. Ann N Y Acad Sci 2006;1078:285-90.
- Johnson WJ; Pedersen Jr CE. Plaque formation by strains of spotted fever rickettsiae in monolayer cultures of various cell types. J Clin Microb 1978 Apr; 7(4): 389-91.
- Karpathy SE, Dasch GA, Ereemeeva ME. Molecular typing of isolates of *Rickettsia rickettsii* by use of DNA sequencing of variable intergenic regions. J Clin Microbiol 2007 Aug;45(8):2545-53.
- Katz G; Neves CFLV; Angerami RN; Nascimento EMM; Colombo S. Situação epidemiológica e importância da febre maculosa no Estado de São Paulo. Bepa 2009; 6(69):4-13.
- Kwok S, Higuchi, R. Avoiding false positive PCR. Nature 1989; 339:237-38.
- La Scola B, Raoult D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. J Clin Microbiol 1997 Nov; 35(11):2715-27. Review

Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, Pinter A et al. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. J Clin Microbiol 2004 Jan; 42(1):90-8.

Labruna MB et al. Molecular evidence for a spotted fever group *Rickettsia* species in the tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. J Med Entomol 2004; 41:533-37.

Labruna MB et al. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondônia, Western Amazon, Brazil. J Med Entomol 2004; 41:1073-81.

Labruna MB et al. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from ticks *Haemaphysalis juxtakochi* in the state of São Paulo, Brazil. Appl Environ Microbiol 2007; 73: 869-873.

Labruna MB. Infection by *Rickettsia bellii* and *Candidatus "Rickettsia amblyommii"* in *Amblyoma neumanni* ticks from Argentina. Microb Ecol 2007; 54: 126-133.

Labruna MB, Horta MC, Aguiar DM, Cavalcante GT, Pinter A, Gennari SM, Camargo MA. Prevalence of *Rickettsia* infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro Municipality, Western Amazon, Brazil. Vector – Borne Zoonotic Dis 2007; 7(2):249-55.

Labruna MB. Ecology of *Rickettsia* in South America. Rickettsiology and Rickettsial Disease - Fifth International Conference. Annals of the New York Academy of Sciences 2009; 1166: 156-66.

- Leitner M, Yitzhaki S, Rzutkiewicz S, Keysary A. Polymerase chain reaction-based diagnosis of Mediterranean spotted fever in serum and tissue samples. *Am J Trop Med Hyg* 2002;67 (2):166-69.
- Lemos ERS, Alvarenga FBF, Cintra ML, Ramos MC, Paddock CD, Ferebee TL et al. Spotted fever in Brazil: A seroepidemiological study and description of clinical cases in an endemic area in the state of São Paulo. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65 (4): 329-34.
- Madeira A, Weisbrich J. Surto de febre maculosa no Estado de Santa Catarina. *Rev Bras Parasitol Vet* 2004; 13(supl. I): 364.
- Magalhães O. Contribuição ao conhecimento das doenças do grupo tifo exantemático. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.1952;Rio J, 6.
- Mancini DAP, Nascimento EMM, Tavares VR, Soares MA. A ocorrência de riquetsioses do grupo *Rickettsia rickettsii*. *Rev Saúde Public* 1983; 17:493-99.
- Marrero M, Raoult D. Centrifugation-shell vial technique for rapid detection of Mediterranean spotted fever rickettsia in blood culture. *Am J Trop Med Hyg* 1989 Feb; 40(2):197-9.
- McLeod MP, Qin X, Karpathy SE, Gioia J, Highlander SK, Fox GE et al. Complete genome sequence of *Rickettsia typhi* and comparison with sequences of other *Rickettsiae*. *J Bact* 2004 Sept; 186 (17):5842-55.
- McQuiston JH, Childs JE, Chamberland ME, Tabor E. Transmission of tick-borne agents of disease by blood transfusion: a review of known and potential risks in the United States 2000 March; 40: 274-84.

Melles HHB, Colombo S, Silva MV. Febre maculosa: Isolamento de *Rickettsia* em amostra de biópsia de pele. Rev Inst Med Trop 1992; 34(1): 37-41.

Melles HHB, Colombo S, Lemos ERS. Isolamento de *Rickettsia* em cultura de células Vero. Rev Soc Bras Med Trop 1999; 32(5): 469-73.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília/Distrito Federal: 6ª edição 2006. Febre Maculosa Brasileira.

<http://www.saude.gov.br/bvs>

Nascimento EMM. Isolamento e detecção molecular de riquetsias do Grupo da Febre Maculosa, a partir de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) e espécimes biológicos humanos, procedentes de áreas endêmicas do Estado de São Paulo [Dissertação]. Instituto de Ciências Biomédicas Universidade de São Paulo 2003.

Nascimento EMM, Colombo S. Diagnóstico Laboratorial da Febre Maculosa Brasileira. BEPA 2004 Set; 9:11- 2.

Nascimento EMM, Gehrke FS, Maldonado RA, Colombo S, Silva LJ, Schumaker TT. Detection of Brazilian spotted fever infection by polymerase chain reaction in a patient from the state of São Paulo. Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro. 2005; 100(3):277-79.

Ogrzewalska M et al. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in na Atlantic Forest area in the state of São Paulo, Brazil, with isolation of *Rickettsia* from the tick *Amblyomma longirostre*. J Med Entomol 2008; 45:770-774.

- Ormsbee R, Peacock M, Philip R, Casper E, Plorde J, Gabre-Kidan T, Wright L. Serologic diagnosis of epidemic typhus fever. *Am J Epid* 1977;105(3): 261-71.
- Paddock CD, Fernandez S, Echenique GA, Sumner JW, Reeves WK, Zaki SR, Remondegui CE. Rocky mountain spotted fever in Argentina. *Am J Trop Med Hyg* 2008;78(4):687-92.
- Pinter A, Labruna MB. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1078:523-29.
- Philip RN, Casper EA, Ormsbee RA, Peacock MG, Burgdorfer W. Microimmunofluorescence test for the serological study of Rocky mountain spotted fever and Typhus. *J Clin Microbiol* 1976 Jan; 3(1):51-61.
- Phillip RN, Casper EA, Burgdorfer W, Gerloff RK, Hughes LE, Bell EJ. Serologic typing of rickettsiae of the spotted fever group by microimmunofluorescence. *J Immunol* 1978 Nov ;121(5):1961-68.
- Plank SJ, Teixeira RS, Milanesi ML. Febre maculosa em Salvador: descrição de um caso. *Rev Med Bahia* 1979; 25: 330-4.
- Quesada M, Sanfeliu I, Cardeñosa N, Segura F. Ten years' experience of isolation of *Rickettsia spp.* from blood samples using the shell-vial cell culture assay. *Ann N Y Acad Sci* 2006 Oct; 1078:578-81.
- Quintal D. Historical aspects of the Rickettsioses. *Clin Dermatology* 1999;14: 234-42.

- Renesto P, Ogata H, Audic S, Claverie JM, Raoult D. Some lessons from Rickettsia genomics. FEMS Microb Rev 2005; 29: 99-117.
- Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of the genus Rickettsia by 16S rDNA sequencing. Res Microbiol 1995 Jun;146(5):385-96.
- Roux V, Rydkina E, Ereemeeva M, Raoult D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae Int J Syst Bacteriol 1997 Apr; 47(2):252-61.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (New York).1989.
- Schattner A, Leitner M, Keysary A, Geltner D. Case report: fatal seronegative rickettsial infection diagnosed by the polymerase chain reaction. Am J Med Sci 1992 Jun; 303(6):392-4.
- Sekeyova Z, Roux V, Raoult D. Phylogeny of Rickettsia spp. inferred by comparing sequences of 'gene D', which encodes an intracytoplasmic protein. Int J Syst Evol Microbiol 2001 Jul; 51(Pt 4):1353-60.
- Sexton DJ, Muniz M, Corey GR, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Dumler S et al. Brazilian spotted fever in Espirito Santo, Brazil: description of a focus of infection in a new endemic region. Am J Trop Med Hyg 1993; 49(2): 222-26.
- Silva LJ, Angerami RN, Nascimento EMM. Febre Maculosa Brasileira e Outras Riquetsioses no Brasil. In: Veronesi R., Focaccia R. Editor Científico Roberto Focaccia, 4^a Edição Revista e Atualizada. Tratado de Infectologia, Atheneu, São Paulo. 2010; p.789-805.

- Thorner AR, Walker DH, Petri WA Jr. Rocky mountain spotted fever. Clin Infect Dis 1998 Dec; 21007(6):1353-9; quiz 1360.
- Torres FD. Rocky mountain spotted fever Review. Lancet Infect Dis 2007; 7: 724-32.
- Tzianabos T, Anderson BE, McDade JE. Detection of *Rickettsia rickettsii* in clinical specimens by polymerase chain reaction technology. J Clin Microbiol 1989 Dec; 27(12):2866-68.
- Walker DH, Cain BG, Olmstead PM. Laboratory diagnosis of Rocky Mountain spotted fever by immunofluorescent demonstration of Rickettsia in cutaneous lesions. Am J Clin Pathol 1978 Jun; 69(6):619-23.
- Walker DH, Raoult D. Rickettsia rickettsii and other spotted fever group Rickettsiae (Rocky Mountain Spotted Fever and other spotted fevers). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds.). Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. London:Churchill Livingstone, 2004. v. 2, pp. 2035-42.
- Walker DH, Ismail N. Emerging and re-emerging rickettsioses: endothelial cell infection and early disease events. Nature Reviews/Microbiology 2008 May;; 6:375-86.
- Wang JG, Walker DH, Lenz HliB, Jerells TR. Barbash strain spotted fever group rickettsia is a strain of *Rickettsia conorii* and differs from *Rickettsia sibirica*. Acta Virol 1987; 31: 489-98.
- Wells GM, Woodward TE, Fiset P, Hornick RB. Rocky mountain spotted fever caused by blood transfusion. JAMA 1978 Jun; 239(26):2763-65.

- Wikswa ME, Hu R, Metzger ME, Ereemeeva ME. Detection of *Rickettsia rickettsii* and *Bartonella henselae* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from California. *Med Entomol* 2007Jan; 44(1):158-62.
- Xu W, Raoult D. Taxonomic relationships among spotted fever group. *J Clin Microbiol* 1998; 36(4): 887-96.

Apêndice 1

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Instituto Adolfo Lutz.

Apêndice 2

Dados sobre os pacientes com suspeita clínica de FMB que evoluíram para óbito incluídos neste estudo, e os resultados laboratoriais da IFI, isolamento bacteriano e *Nested* PCR.

Paciente nº	Localização	Idade (anos)	Sexo	Data (dia/mes/ano) de:		IFI		Resultado do isolamento	Resultado do <i>Nested</i> -PCR	nº de nucleotídeos sequenciados/ tamanho do produto amplificado (pb)
				Início dos sintomas	Coleta da amostra	IgG	IgM			
1	ITU	73	M	19/04/07	20/04/07	<64	<64	NEGATIVO	NEGATIVO	NF
2	SUMARÉ	71A	M	05/05/2007	08/05/2007	<64	<64	NF	NEGATIVO	NF
3	CANDIDO MOTTA	33	M	22/04/2007	05/05/2007	>=128	>=128	NF	NEGATIVO	NF
4	SANTOS	5A	M	28/04/2007	30/05/2007	<64	<64	NF	NEGATIVO	NF
5	JAGUARIÚNA	3	F	08/06/2007	13/06/2007	<64	<64	POSITIVO	POSITIVO	214/247
6	CAMPINAS	4A	F	25/06/2007	01/07/2007	<64	<64	NF	NEGATIVO	NF
7	VALINHOS	45	M	08/07/2007	08/07/2007	<64	128	NF	NEGATIVO	NF
8	ASSIS	37		28/07/2007	02/08/2007	<64	<64	NF	POSITIVO	200/247
9	SÃO PAULO	13	M	20/08/2007	28/08/2007	>=128	>=128	POSITIVO	NEGATIVO	NF
10	LIMEIRA	62	M	24/08/2007	25/08/2007	<64	<64	NF	POSITIVO	210/247
11	CAMPINAS	34	F	06/04/2007	12/04/2007	<64	<64	POSITIVO	NEGATIVO	NF
12	HORTOLÂNDIA	19A	F	05/04/2007	07/04/2007	<64	<64	NF	NEGATIVO	NF
13	CAMPINAS	38	F	10/03/2007	17/03/2007	<64	<64	NF	NEGATIVO	NF
14	PIRACICABA	2A	F	19/07/2007	21/07/2007	<64	<64	NF	NEGATIVO	NF
15	CAMPINAS	37	M	24/05/2007	29/05/2007	<64	<64	POSITIVO	POSITIVO	200/247
16	SUMARÉ	39	M	17/05/2007	23/05/2007	<64	<64	NF	POSITIVO	188/247
17	PIRACICABA	52A	M	19/02/2007	21/02/2007	<64	<64	NF	NEGATIVO	NF
18	PIRACICABA	38A	M	06/02/2007	08/02/2007	<64	<64	NEGATIVO	NEGATIVO	NF
19	JAGUARIÚNA	60	F	28/10/2006	02/11/2006	<64	<64	NF	POSITIVO	212/247
20	SANTO ANDRÉ	47A	F	24/10/2006	27/10/2006	<64	<64	NF	NEGATIVO	NF
21	CAMPINAS	42	M	02/07/2007	06/07/2007	<64	<64	NEGATIVO	POSITIVO	219/247
22	AMERICANA	24A	F	28/05/2007	03/06/2007	<64	<64	NF	NEGATIVO	NF
23	SOCORRO	71A	M	05/06/2007	06/06/2007	<64	<64	NEGATIVO	NEGATIVO	NF
24	VINHEDO	63	M	31/08/2007	03/09/2007	<64	<64	NF	POSITIVO	233/247
25	CAMPINAS	73A	M	21/10/2006	25/10/2006	<64	<64	NF	NEGATIVO	NF
26	ÁGUAS DE LINDÓIA	37	M	27/10/2006	06/11/2006	<64	<64	POSITIVO	POSITIVO	240/247
27	PIRACICABA	52A	M	12/09/2007	12/09/2007	<64	<64	NF	NEGATIVO	NF
28	ARARAS	57	F	11/09/2007	13/09/2007	<64	<64	NF	POSITIVO	218/247
29	ARARAS	13	F	07/12/2006	12/12/2006	<64	<64	NF	POSITIVO	153/247
30	MOGI DAS CRUZES	NÃO CONSTA	M	02/12/2006	09/12/2006	<64	<64	NF	NEGATIVO	NF
31	VINHEDO	46A	M	26/09/2006	29/09/2006	<64	<64	NF	NEGATIVO	NF
32	PEDREIRA	52	M	10/10/2006	13/10/2006	<64	<64	NF	POSITIVO	217/247
33	SÃO PAULO	6A	M	10/10/2007	16/10/2007	<64	<64	NF	NEGATIVO	NF
34	HORTOLÂNDIA	2A	M	01/11/2007	05/11/2007	<64	<64	NF	NEGATIVO	NF
35	SÃO PAULO	29A	F	07/08/2006	16/08/2006	<64	<64	NF	NEGATIVO	NF
36	CAMPINAS	61	M	27/07/2006	03/08/2006	<64	<64	POSITIVO	POSITIVO	234/247
37	CAMPINAS	45A	M	27/07/2006	31/07/2006	<64	<64	NF	NEGATIVO	NF
38	HORTOLÂNDIA	62	M	15/07/2006	23/07/2006	<64	<64	NF	POSITIVO	234/247
39	MOGI GUAÇÚ	46A	M	26/06/2006	05/07/2006	<64	<64	NF	NEGATIVO	NF
40	CAMPINAS	33A	F	07/06/2006	12/06/2006	<64	<64	NF	NEGATIVO	NF
41	SANTO ANDRÉ	35A	M	08/11/2007	11/11/2007	<64	<64	NF	NEGATIVO	NF
42	DIADEMA	20	M	13/11/2007	19/11/2007	<64	<64	NF	POSITIVO	221/247
43	SANTOS	6A	F	08/05/2006	10/05/2006	<64	<64	NF	NEGATIVO	NF
44	SANTO ANDRÉ	3	M	08/04/2006	21/04/2006	>=128	>=128	NF	NEGATIVO	NF
45	JAGUARIÚNA	55	M	09/11/2006	13/11/2006	<64	<64	POSITIVO	POSITIVO	233/247
46	PORTUGUAL	NÃO CONSTA	M	NÃO CONSTA	26/07/2005	<64	64	POSITIVO	POSITIVO	210/247
47	DIADEMA	5A	M	28/08/2006	01/09/2006	<64	<64	NF	POSITIVO	204/247
48	PAULÍNIA	24A	M	01/10/2007	05/10/2007	<64	<64	NEGATIVO	POSITIVO	234/247
49	PIRACICABA	48A	M	15/10/2006	16/10/2006	<64	<64	NF	NEGATIVO	NF
50	JUNDIAÍ	37A	M	12/10/2007	17/10/2007	64	<64	NEGATIVO	POSITIVO	217/247

Localização= procedência preenchida no pedido do exame. Em resultado do isolamento NF= não feito, material não enviado para o exame; em nº de nucleotídeos sequenciados/tamanho do produto amplificado (pb) NF= não feito, não necessário.

Apêndice 3

Alinhamento das sequências de nucleotídeos da região do antígeno 17 kDa comum às riquetsias do Grupo da Febre Maculosa. As sequências foram alinhadas para obter-se máxima homologia com *R. rickettsii* cepa Sheila Smith. As sequências das amostras estão identificadas como #SAMP_ nº da amostra. [] está o nº de nucleotídeos sequenciados de cada amostra. Os pontos [.] indicam sequências idênticas. #SAMP_1413-04 refere-se ao sequenciamento do controle positivo utilizado no estudo. * Programa utilizado: MEGALIGN (DNASTAR, Inc. Madison, Wis. USA)

48

```

      1
#SHEILA  TTC TCA ATT CGG TAA GGG CAA AGG ACA GCT TGT TGG AGT AGG TGT AGG
#SAMP_5   ... ..
#SAMP_8   --- ---
#SAMP_10  --- ---
#SAMP_15  --- ---
#SAMP_16  --- ---
#SAMP_19  --- ---
#SAMP_21  --- ---
#SAMP_24  --- ---
#SAMP_26  --- ---
#SAMP_28  --- ---
#SAMP_29  --- ---
#SAMP_32  --- ---
#SAMP_36  --- ---
#SAMP_38  --- ---
#SAMP_42  --- ---
#SAMP_45  --- ---
#SAMP_46  --- ---
#SAMP_47  --- ---
#SAMP_48  --- ---
#SAMP_50  --- ---
#SAMP_1413-04 --- ---

```

4996

#SHEILA_SMITH TGC ATT ACT TGG AGC AGT TCT TGG TGG ACA AAT CGG TGC AGG TAT GGA

#SAMP_5

#SAMP_8

#SAMP_10

#SAMP_15

#SAMP_16 --- ^.. ..

#SAMP_19

#SAMP_21

#SAMP_24

#SAMP_26

#SAMP_28

#SAMP_29 --- --- --- --- --- ^.. ..

#SAMP_32

#SAMP_36

#SAMP_38

#SAMP_42

#SAMP_45

#SAMP_46

#SAMP_47

#SAMP_48

#SAMP_50

#SAMP_1413-04

97144

#SHEILA_SMITH TGA ACA GGA TAG AAG ACT TGC AGA GCT TAC CTC ACA GAG AGC TTT AGA

#SAMP_5

#SAMP_8

#SAMP_10

#SAMP_15

#SAMP_16

#SAMP_19

#SAMP_21

#SAMP_24

#SAMP_26

#SAMP_28

#SAMP_29

#SAMP_32

#SAMP_36

#SAMP_38

#SAMP_42

#SAMP_45

#SAMP_46

#SAMP_47

#SAMP_48

#SAMP_50

#SAMP_1413-04

	145		192
#SHEILA_SMITH	AAC AGC TCC TAG TGG TAG TAA CGT AGA ATG GCG TAA TCC GGA TAA CGG		
#SAMP_5	...		
#SAMP_8	...		
#SAMP_10	...		
#SAMP_15	...		
#SAMP_16	...		
#SAMP_19	...		
#SAMP_21	...		
#SAMP_24	...		
#SAMP_26	...		
#SAMP_28	...		
#SAMP_29	...		
#SAMP_32	...		
#SAMP_36	...		
#SAMP_38	...		
#SAMP_42	...		
#SAMP_45	...		
#SAMP_46	...		
#SAMP_47	...		
#SAMP_48	...		
#SAMP_50	...		
#SAMP_1413-04	...		

	193		240
#SHEILA_SMITH	CAA TTA CGG TTA CGT AAC ACC TAA TAA AAC TTA TAG AAA TAG CAC TGG		
#SAMP_5	...		
#SAMP_8	...		
#SAMP_10	...		
#SAMP_15	...		
#SAMP_16	...		
#SAMP_19	...		
#SAMP_21	...		
#SAMP_24	...		
#SAMP_26	...		
#SAMP_28	...		
#SAMP_29	...		
#SAMP_32	...		
#SAMP_36	...		
#SAMP_38	...		
#SAMP_42	...		
#SAMP_45	...		
#SAMP_46	...		
#SAMP_47	...		
#SAMP_48	...		
#SAMP_50	...		
#SAMP_1413-04	...		

#SHEILA_SMITH TCA ATA T [247]

#SAMP_5	--- --- -	[214]
#SAMP_8	 -	[200]
#SAMP_10	-----	[210]
#SAMP_15	-----	[200]
#SAMP_16	-----	[188]
#SAMP_19	-----	[212]
#SAMP_21	-----	[219]
#SAMP_24	-----	[233]
#SAMP_26	.- ----	[240]
#SAMP_28	-----	[218]
#SAMP_29	-----	[153]
#SAMP_32	-----	[217]
#SAMP_36	-----	[234]
#SAMP_38	-----	[234]
#SAMP_42	.- ----	[221]
#SAMP_45	-----	[233]
#SAMP_46	-----	[210]
#SAMP_47	-----	[204]
#SAMP_48	-----	[234]
#SAMP_50	-----	[217]
#SAMP_1413-04	--- --- -	[204]

Apêndice 4

Trabalhos Publicados:

Nascimento EMM, Colombo S., Nagasse-Sugahara TK., Angerami RN, Resende MR, SilvaLJ,. Katz G, Santos FCP. Evaluation of PCR-based assay in human serum samples for diagnosis of fatal cases of spotted fever group rickettsiosis (DOI 10.1111/j.1469-0691.2008.02153).

Angerami RN, Nunes EM, **Nascimento EMM**, Ribas Freitas A, Kemp B, Feltrin AFC, Pacola MR, Perecin GEC, Sinkoc V, Ribeiro Resende M, Katz G, Silva LJ. Clusters of Brazilian spotted fever,southeastern Brazil. A review of official reports and the scientific literature (DOI: 101111/j.149-0691.2008.02637).