

FABIANA CRISTINA PEREIRA DOS SANTOS

**Aplicações da PCR em tempo real no diagnóstico  
laboratorial da Febre Maculosa Brasileira**

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: Infectologia  
em Saúde Pública**

**Orientador: Prof. Dr. Marcos  
Vinícius da Silva**

SÃO PAULO  
2014

***“Grandes coisas fez o Senhor por nós,  
por isso estamos alegres”***

*Salmos 126:3*

***Este trabalho é dedicado...***

À **Deus**, a razão de tudo que faço.

Ao meu esposo Luís Eduardo pela paciência e incentivo nos momentos difíceis.

Aos meus filhos Gabriel e Daniel, projetos mais importantes e gratificantes da minha vida.

Aos meus pais, Osvaldo e Eliana, pois, sem o apoio e investimento deles não teria chegado até aqui.

Aos meus irmãos, Valéria, Miler e Patrícia, por preencherem minha vida dando um significado singular à palavra família.

## ***Agradecimentos***

Ao querido Prof. Dr. Marcos Vinícios da Silva, por me dado oportunidade de aprender muito mais do que esperava, tanto profissional como pessoalmente.

Aos professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, particularmente à Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes Braga e à Profa. Dra. Ana Maria de Oliveira, por terem me fornecido as bases da formação acadêmica e estimulado em mim o amor à pesquisa.

Ào Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, em nome da Coordenadora Profa. Dra. Maria de Fátima Costa Pires.

Ao Dr. Helio Hehl Caiaffa Filho, diretor geral do Instituto Adolfo Lutz; à Dra Maria do Carmo S. T. Timenetsky, diretora do Centro de Virologia e à Akemi Suzuki, diretora do Núcleo de Doenças de Transmissão Vetorial pelo incentivo, apoio e oportunidade para realização desta tese.

Às minhas colegas do laboratório de riquetsias: Elvira, Silvia e Nilceia pelo suporte durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos riquetsiologistas, Dr. Rodrigo Nogueira Angerami, Dr. Marcos Vinicius da Silva, Dr. Marcelo Bahia Labruna, Dr. Adriano Pinter, Dra Gizelda Katz, Dra. Roosecelis A Brasil, pela colaboração indispensável na produção do conhecimento sobre as riquetsioses no Brasil.

Aos Colegas do IAL, particularmente os do Centro de Virologia pelo incentivo à pesquisa, exemplo e persistência em buscar o melhoramento dos serviços de saúde pública.

## RESUMO

A Febre Maculosa Brasileira (FMB), causada pela *Rickettsia rickettsii*, é a principal doença transmitida por carrapato com impacto em saúde pública no Brasil. Os primeiros sintomas são inespecíficos, porém a doença pode evoluir rapidamente para quadro de Síndrome Febril Hemorrágica Aguda (SFHA) com a ocorrência de óbito em poucos dias. O objetivo deste estudo foi verificar as aplicações da PCR em tempo real na rotina laboratorial para o diagnóstico etiológico da FMB, em amostras biológicas encaminhadas ao Laboratório de Riquetsias do Instituto Adolfo Lutz. Foram testados 2 protocolos de PCR em tempo real: um para detecção do gênero *Rickettsia* spp (*gltA-TaqMan*®) com detecção por sonda TaqMan® e outro para riquetsias do Grupo Febre Maculosa (*OmpA-SYBR*) com detecção por SYBRGreen. O protocolo de PCR em tempo real para RNaseP foi utilizado como controle interno endógeno. A amostragem foi constituída de sangue, soro, coágulo e biópsia de pele de lesão de casos fatais e não fatais com suspeita clínica de FMB. Os resultados mostraram que o protocolo *OmpA-SYBR* sofre interferência da matriz biológica e os melhores resultados com relação à sensibilidade foram obtidos quando utilizado em amostras de soro. Os protocolos de PCR em tempo real *gltA-TaqMan*® e *OmpA-SYBR* apresentaram concordância de resultados acima de 90%. O protocolo *gltA-TaqMan*® mostrou-se mais sensível do que o protocolo *OmpA-SYBR*, porém com menor especificidade, particularmente para amostras com CT>36. O melhor desempenho da PCR em tempo real para FMB, foi obtido quando a FMPCR, composta do três protocolos: *gltA-TaqMan*®, *OmpA-SYBR* e RNaseP humana, foi utilizada em amostras de soro para detecção do agente etiológico da FMB nos casos fatais. A PCR em tempo real para FMB apresentou baixa sensibilidade para detectar casos não fatais, confirmados pela sorologia para FMB, com positividade de 21%. Os resultados deste estudo indicam que a FMPCR apresenta sensibilidade e especificidade que permitem utilizá-la como ferramenta laboratorial no diagnóstico da FMB para elucidação de casos fatais, com suspeita da doença.

## ABSTRACT

Brazilian Spotted Fever (BSF) is the main tick borne disease with impact on public health in Brazil. Early symptoms are nonspecific, but the disease may progress rapidly to Febrile Acute Hemorrhagic Syndrome (SFHA) with occurrence of death within a few days. The purpose of this study was to investigate the applications of real-time PCR in the routine laboratory for the etiologic diagnosis of BSF, in the biological samples sent to the laboratory. Two real-time PCR protocols were tested: one for detecting the genus *Rickettsia* spp (*gltA-TaqMan*®) with detection by TaqMan® probe and another for specific detection of Spotted Fever Group species (*OmpA-SYBR*) by SYBR Green detection. The qPCR protocol for RNaseP was used as endogenous internal control. Samples used were blood, serum, blood clot and biopsy from skin lesion of fatal and nonfatal clinically suspected of BSF. The results showed that *ompA-SYBR* protocol suffers interference from the biological matrix and the best performance was obtained with serum samples. Protocols *OmpA-SYBR* and *gltA-TaqMan*® showed results concordance up to 90%. The protocol *gltA-TaqMan*® was more sensitive than *OmpA-SYBR* protocol, but less specificity, particularly for samples with TC > 36. The best performance for BSF qPCR assay was obtained when combining three qPCR protocols (*OmpA-SYBR*, *gltA-TaqMan*® and RnaseP), named FMPCR, were used in serum samples to detection BSF in fatal cases. FMPCR showed low sensitivity for detecting non-fatal cases positive by IFA, the positivity was 21%. The results of this study indicate that FMPCR has sensitivity and specificity to be used as a diagnostic tool for elucidation of fatal BSF.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ATBF</b>	<i>African tick-bite fever</i>
<b>ATV</b>	Solução de Tripsina 0,2% e Versene 0,02% para descolamento de cultura de células aderidas
<b>BHI</b>	Meio de infusão cérebro coração ( “Brain Heart Infusion”)
<b>CDC</b>	<i>Center for Disease Control and Prevention</i> - Centro de Controle de Doenças e Prevenção, Atlanta, Geórgia, Estados Unidos da América do Norte (EUA)
<b>CT</b>	Número do ciclo onde a amplificação cruzou o <i>threshold</i>
<b>CVE</b>	Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof Alexandre Vranjac”
<b>DEBONEL</b>	<i>Dermacentor-borne necrosis erythema lymphadenopathy</i>
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> - Ácido desoxirribonucleico
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> - Ensaio Imunoenzimático
<b>EPI</b>	Equipamento de proteção individual
<b>FMB</b>	Febre Maculosa Brasileira
<b>FMMR</b>	Febre Maculosa das Montanhas Rochosas- EUA
<b>G</b>	Aceleração da gravidade
<b>GFM</b>	Grupo da Febre Maculosa
<b>GT</b>	Grupo Tifo
<b>IAL</b>	Instituto Adolfo Lutz
<b>IgG</b>	Imunoglobulina do tipo G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina do tipo M
<b>IHQ</b>	Ensaio de Imunohistoquímica
<b>ISSO</b>	Ensaio de isolamento de riquetsias em cultura de células
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LAR</b>	<i>Lymphangitis-Associated Rickettsioses</i>
<b>LRIAL</b>	Laboratório de Riquetsias do IAL
<b>MSF-like</b>	<i>Mediterranean Spotted Fever</i> – like
<b>OmpA</b>	<i>Outher membrane protein A</i> - proteína externa de membrana A, exclusiva de riquetsias Grupo Febre Maculosa

<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Salina em tampão fosfato ( <i>Phosphate-Buffered Saline</i> ), pH:7,2
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
<b>Primer</b>	Oligonucleotídeo iniciador da reação de PCR
<b>Probe</b>	Oligonucleotídeo marcado com fluorescência utilizado para sinalizar a amplificação do fragmento de DNA em uma reação de qPCR
<b>qPCR</b>	PCR em tempo real quantitativo
<b>RGFM</b>	Riquetsias do Grupo da Febre Maculosa
<b>RIFI</b>	Reação de Imunofluorescência Indireta
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic Acid</i> - Ácido ribonucleico
<b>SENLAT</b>	<i>Scalp Eschar and Neck Lymphadenopathy</i>
<b>SFHA</b>	Síndrome Febril Hemorrágica Aguda
<b>SIGH</b>	Sistema de Informações e Gestão do Instituto Adolfo Lutz.
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SBF</b>	Soro Bovino Fetal
<b>SYBR Green</b>	Intercalante de fita de DNA fluorescente responsável na qPCR por sinalizar a amplificação de fitas duplas produzidas
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TaqMan®</b>	Probe específica marcada com agente fluorescente (FAM) responsável por sinalizar a amplificação do fragmento alvo.
<b>Template</b>	Fragmento de DNA alvo para amplificação
<b>TIBOLA</b>	<i>Tick-Borne Lymphadenopathy</i>
<b>Threshold</b>	Limiar definido pelo software do equipamento de qPCR considerando o sinal basal de fluorescência e a fase exponencial das curvas amplificadas para amostras processadas sob as mesmas condições.
<b>Vero</b>	Linhagem celular permanente de rim de macaco verde africano

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



## LISTA DE TABELAS GRÁFICOS E FIGURAS

		Pág
<b>Figura 1</b>	Ciclo de vida das riquetsias transmitidas por carrapatos	04
<b>Figura 2</b>	Distribuição geográfica dos patógenos riquetsiais do Grupo da Febre Maculosa conhecido	06
<b>Gráfico 1</b>	Número de casos confirmados e óbitos por FMB no Estado de São Paulo de 1985 a 2012	09
<b>Figura 3</b>	Região geográfica dos municípios com casos confirmados de FMB no Estado de São Paulo entre 1998 e 2012	10
<b>Figura 4</b>	Curso temporal dos marcadores gerais das doenças riquetsiais (Febre Maculosa e outras riquetsioses humanas) em relação à detecção e diagnóstico.	17
<b>Figura 5</b>	Fluxograma da casuística e amostragem, incluída no estudo das aplicações da PCR em tempo real no diagnóstico laboratorial da FMB, selecionados entre 2005 e 2012 no LRIAL.	24
<b>Tabela 1</b>	Oligonucleotídeos iniciadores ( <i>primer e probe</i> ) utilizados nos protocolos de PCR em tempo real para detecção de <i>Rickettsia</i> spp e controle interno endógeno, em amostras biológicas de pacientes com suspeita clínica/epidemiológica de FMB, analisados no LRIAL entre 2005 e 2012.	29
<b>Tabela 2</b>	Casos suspeitos de FMB e indivíduos hígidos avaliados pela PCR em tempo real para <i>Rickettsia</i> spp, no LRIAL no período de 2005 a 2012.	36
<b>Tabela 3</b>	Casos suspeitos de FMB e indivíduos hígidos avaliados pela PCR em tempo real para <i>Rickettsia</i> spp, no LRIAL no período de 2005 a 2012, distribuídos segundo sexo e faixa etária.	37
<b>Gráfico 2</b>	Distribuição dos casos suspeitos de FMB segundo o município de origem, avaliados pela PCR em tempo real para <i>Rickettsia</i> spp, no LRIAL entre 2005 e 2012.	37
<b>Figura 6</b>	Distribuição geográfica dos municípios de Santa Catarina com casos de FMB diagnosticados pela sorologia e PCR em tempo real <i>Rickettsia</i> spp, realizados no LRIAL, entre 2005 e 2012.	38
<b>Tabela 4</b>	Emprego da PCR em tempo real no diagnóstico da FMB considerando-se o tempo transcorrido entre o início da doença e a coleta de amostra biológica para o diagnóstico realizado no LRIAL no período entre 2005 e 2012	39
<b>Gráfico 3</b>	Informação sobre a antibioticoterapia nos casos suspeitos de FMB avaliados pela PCR em tempo real para <i>Rickettsia</i> spp, no LRIAL entre 2005 e 2012.	40
<b>Gráfico 4</b>	Diagnósticos diferenciais casos suspeitos de FMB avaliados pela PCR em tempo real para <i>Rickettsia</i> spp, no LRIAL entre 2005 e 2012.	40
<b>Figura 7</b>	Perfil logarítmico da absorvância emitida durante cada ciclo no protocolo da curva de concentração decrescente para o protocolo de PCR em tempo real <i>gltA-TaqMan®</i> .	41

<b>Gráfico 5</b>	Curva padrão de eficiência para o protocolo de PCR em tempo real <i>gltA-TaqMan®</i> , analisado no equipamento ABI7500, utilizando como alvo DNA de <i>Rickettsia rickettsii</i> extraída de co-cultivo de células Vero.	<b>41</b>
<b>Figura 8</b>	Perfil linear da absorvância emitida durante cada ciclo da curva de concentração decrescente para o protocolo de PCR em tempo real <i>OmpA-SYBR</i>	<b>42</b>
<b>Figura 9</b>	Padrão de dissociação ( <i>melting</i> ) dos produtos amplificados na curva concentração decrescente para o protocolo de PCR em tempo real <i>OmpA-SYBR</i> .	<b>42</b>
<b>Gráfico 6</b>	Curva padrão de eficiência para o protocolo de PCR em tempo real <i>OmpA-SYBR</i> . Foi utilizado DNA de <i>Rickettsia rickettsii</i> extraído de co-cultivo em células Vero.	<b>43</b>
<b>Tabela 5</b>	Avaliação do desempenho dos protocolos de PCR em tempo real para o diagnóstico laboratorial da FMB, realizados no LRIAL entre 2005 e 2012	<b>44</b>
<b>Figura 10</b>	Sinal da absorvância emitida durante cada ciclo no protocolo de PCR em tempo real <i>OmpA-SYBR</i> utilizado para o diagnóstico laboratorial da FMB, analisado pelo equipamento ABI 7500.	<b>46</b>
<b>Figura 11</b>	Curvas de dissociação dos fragmentos amplificados no protocolo de PCR em tempo real <i>OmpA-SYBR</i> utilizado para o diagnóstico laboratorial da FMB, analisado pelo software do equipamento ABI 7500	<b>46</b>
<b>Figura 12</b>	Absorvância emitida durante cada ciclo no protocolo de PCR em tempo real <i>gltA-TaqMan®</i> utilizado para o diagnóstico laboratorial da FMB, analisado no equipamento: Light Cycler II-480- Roche.	<b>47</b>
<b>Tabela 6</b>	Resultados dos protocolos de PCR em tempo real para o diagnóstico laboratorial da FMB e RNaseP humana nos grupos analisados no LRIAL entre 2005 a 2012.	<b>47</b>
<b>Gráfico 7</b>	Valores de CT obtidos nos protocolos de PCR em tempo real <i>gltA-TaqMan®</i> e <i>ompA-SYBR</i> utilizados para o diagnóstico laboratorial da FMB no grupo dos óbitos, em amostra de soro, analisadas no LRIAL entre 2005 e 2012.	<b>48</b>
<b>Gráfico 8</b>	Valores de CT obtidos nos protocolos de PCR em tempo real <i>gltA-TaqMan®</i> e <i>ompA-SYBR</i> utilizados para o diagnóstico laboratorial da FMB no grupo de soroconversões, em amostra de soro, analisadas no LRIAL entre 2005 e 2012.	<b>48</b>
<b>Gráfico 9</b>	Valores de CT obtidos nos protocolos de PCR em tempo real para o controle interno endógeno (RNaseP humana) no grupo de óbitos, em amostra de soro, analisadas no LRIAL entre 2005 e 2012.	<b>49</b>
<b>Gráfico 10</b>	Valores de CT obtidos nos protocolos de PCR em tempo real para o controle interno endógeno (RNaseP humana) no grupo de soroconversões, em amostra de soro, analisadas no LRIAL entre 2005 e 2012.	<b>49</b>
<b>Gráfico 11</b>	Valores de CT obtidos nos protocolos de PCR em tempo real para o controle interno endógeno (RNaseP humana) no grupo de soronegativos, em amostra de soro, analisadas no LRIAL entre 2005 e 2012.	<b>50</b>

<b>Gráfico 12</b>	Valores de CT obtidos nos protocolos de PCR em tempo real para o controle interno endógeno (RNaseP humana) no grupo de controles hígidos, em amostra de soro, analisadas no LRIAL entre 2005 e 2012.	<b>50</b>
<b>Tabela 7</b>	Comparação entre os resultados obtidos com os protocolos de PCR em tempo real <i>gltA-TaqMan®</i> e <i>ompA-SYBR</i> utilizados para o diagnóstico laboratorial da FMB, no grupo de óbitos, em amostras enviadas para sorologia para FMB analisadas no LRIAL entre 2005 e 2012.	<b>51</b>
<b>Tabela 8</b>	Comparação entre os resultados obtidos com os protocolos de PCR em tempo real <i>gltA-TaqMan®</i> e <i>ompA-SYBR</i> utilizados para o diagnóstico laboratorial da FMB, no grupo de soroconversões, em amostras de soro analisadas no LRIAL entre 2005 e 2012.	<b>52</b>
<b>Tabela 9</b>	Comparação dos resultados qualitativos obtidos com os protocolos de PCR em tempo real <i>gltA-TaqMan®</i> e <i>ompA-SYBR</i> utilizados para o diagnóstico laboratorial da FMB no grupo de óbitos, em amostras de sangue <i>post-mortem</i> , analisadas no LRIAL entre 2005 e 2012.	<b>53</b>
<b>Tabela 10</b>	Comparação entre os protocolos de PCR em tempo real <i>ompA-SYBR</i> (A) e <i>gltA-TaqMan®</i> (B) utilizados para o diagnóstico laboratorial da FMB em amostra de sangue <i>post-mortem</i> versus soro, no grupo de óbitos analisados no LRIAL entre 2005 e 2012.	<b>54</b>
<b>Tabela 11</b>	Comparação entre os protocolos de PCR em tempo real <i>gltA-TaqMan®</i> e <i>ompA-SYBR</i> utilizados para o diagnóstico laboratorial da FMB, no grupo de óbitos, em amostras de coágulo sanguíneo analisadas no LRIAL entre 2005 e 2012.	<b>54</b>
<b>Tabela 12</b>	Comparação dos protocolos de PCR em tempo real <i>ompA-SYBR</i> (A) e <i>gltA-TaqMan®</i> (B) utilizados para o diagnóstico laboratorial da FMB, em amostra de soro e coágulo sanguíneo do grupo de pacientes que evoluíram para o óbito, analisados no LRIAL entre 2005 e 2012.	<b>56</b>
<b>Tabela 13</b>	Comparação entre os protocolos de PCR em tempo real <i>ompA-SYBR</i> (A) e <i>gltA-TaqMan®</i> (B) utilizados para o diagnóstico laboratorial da FMB, no grupo de soroconversões, em amostra de soro e coágulo sanguíneo, analisadas no LRIAL entre 2005 e 2012.	<b>57</b>
<b>Tabela 14</b>	Comparação entre os protocolos de PCR em tempo real <i>ompA-SYBR</i> e <i>gltA-TaqMan®</i> utilizados para o diagnóstico laboratorial da FMB, no grupo de óbitos, em amostras de biópsia de pele analisadas no LRIAL entre 2005 e 2012.	<b>57</b>
<b>Tabela 15</b>	Comparação dos protocolos de PCR em tempo real <i>ompA-SYBR</i> (A) e <i>gltA-TaqMan®</i> (B) utilizados para o diagnóstico laboratorial da FMB, no grupo de óbitos, em amostra de soro e pele, analisadas no LRIAL entre 2005 a 2012.	<b>58</b>

<b>Tabela 16</b>	Resultados obtidos em cada uma das técnicas disponíveis para o diagnóstico da FMB, nas diferentes espécimes biológicas, nos grupos analisados no LRIAL entre 2005 a 2012.	<b>59</b>
<b>Tabela 17</b>	Comparação entre os resultados obtidos empregando-se a <i>nested</i> PCR, seguida de sequenciamento gênico e a FMPCR ( <i>ompA</i> -SYBR, <i>gltA</i> - <i>TaqMan</i> ® e RNaseP) em 50 amostras de soro de casos fatais analisados no LRIAL entre 2005 e 2012.	<b>60</b>
<b>Tabela 18</b>	Comparação entre os resultados obtidos pela FMPCR e outras técnicas de detecção etiológica (IHQ, ISO e qPCR), no grupo de casos fatais selecionados para avaliação da sensibilidade e especificidade da PCR em tempo real para o diagnóstico da FMB, analisados no LRIAL entre 2005 a 2012.	<b>61</b>
<b>Tabela 19</b>	Comparação entre resultados obtidos empregando-se FMPCR e sorologia pela RIFI para FMB, em amostras de soro de pacientes que evoluíram para o óbito, analisadas no LRIAL entre 2005 e 2012.	<b>62</b>
<b>Tabela 20</b>	Frequência de casos de FMB confirmados pela PCR em tempo real distribuídos de acordo com sexo e faixa etária, nos grupos de óbitos e soroconversões analisados no LRIAL entre 2005 e 2012.	<b>64</b>
<b>Gráfico 13</b>	Casos de FMB confirmados pela PCR em tempo real distribuídos por região geográfica, nos grupos de óbito e soroconversões analisados no LRIAL entre 2005 e 2012.	<b>65</b>
<b>Tabela 21</b>	Casos de FMB confirmados pela PCR em tempo real de acordo com o tempo transcorrido entre o início dos sintomas da doença e a coleta de amostra biológica para diagnóstico da FMB, analisados no LRIAL entre 2005 e 2012.	<b>65</b>
<b>Gráfico 14</b>	Valores de CT dos casos de FMB confirmados pelo protocolo de PCR em tempo real <i>gltA</i> - <i>TaqMan</i> ® em relação ao intervalo entre a apresentação da doença e a coleta da primeira amostra biológica para diagnóstico de FMB, no grupo de pacientes que evoluíram para o óbito analisados no LRIAL entre 2005 e 2012.	<b>67</b>
<b>Gráfico 15</b>	Valores de CT dos casos de FMB confirmados pelo protocolo de PCR em tempo real <i>gltA</i> - <i>TaqMan</i> ® em relação ao intervalo entre a apresentação da doença e a coleta da primeira amostra biológica para diagnóstico de FMB, no grupo de soroconversões, analisados no LRIAL entre 2005 e 2012.	<b>67</b>
<b>Gráfico 16</b>	Casos fatais com suspeita clínica de FMB distribuídos de acordo com o resultado da PCR em tempo real para FMB, em relação à informação sobre o uso de antibiótico no tratamento do paciente analisados no LRIAL entre 2005 e 2012.	<b>68</b>
<b>Gráfico 17</b>	Casos de soroconversões para FMB distribuídos de acordo com o resultado da PCR em tempo real para FMB, em relação à informação sobre o uso de antibiótico no tratamento do paciente analisados no LRIAL entre 2005 e 2012.	<b>68</b>
<b>Gráfico 18</b>	Casos fatais com suspeita clínica de FMB e outras patologias que compõem o diagnóstico diferencial da FMB, distribuídas de acordo com a detecção etiológica confirmada, analisados no LRIAL entre 2005 e 2012.	<b>69</b>

## ÍNDICE

<b>1. Introdução</b>	<b>3</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>21</b>
2.1. Objetivo geral	21
2.2. Objetivos específicos	21
<b>3. Justificativa</b>	<b>22</b>
<b>4. Casuística e Métodos</b>	<b>23</b>
4.1. Casuística	23
4.2. Amostragem	23
4.3. Aspectos Éticos	24
4.4. Métodos	25
4.4.1. Extração de ácido nucléico de amostras clínica	25
4.4.2. PCR em tempo real para FMB	26
4.4.3. Validação dos ensaios de PCR em tempo real	29
4.4.4. Pesquisa de anticorpos para FMB em amostras de soro	31
4.4.5. Isolamento de riquetsias do GFM em cultura de células	33
4.4.6. Análise estatística	34
<b>5. Resultados</b>	<b>36</b>
5.1. Validação dos ensaios de PCR em tempo real	41
5.2. Aplicação dos protocolos de PCR em tempo real nos grupos de estudo	47

5.3. Correlação entre os protocolos de PCR em tempo real para <i>Rickettsia</i> spp nas amostras analisadas	51
5.4. Correlação entre a positividade e o tipo de amostra	52
5.5. Especificidade e Sensibilidade da PCR em tempo real para FMB	60
5.6. Comparação dos resultados da FMPCR e outros exames realizados no IAL	61
5.7. Análise descritiva dos casos confirmados pela FMPCR	64
<b>6. Discussão</b>	<b>70</b>
<b>7. Conclusões</b>	<b>91</b>
<b>8. Referências Bibliográficas</b>	<b>92</b>
<b>9. Anexos</b>	<b>103</b>
<b>Anexo I.</b> Aprovação do projeto no CTC e CEP-IAL	
<b>Anexo II.</b> Trabalhos Publicados	
<b>Anexo III.</b> Distribuição dos casos confirmados de Febre Maculosa, segundo município de infecção no Estado de São Paulo, 1998 - 2012.	
<b>Anexo VI.</b> Gráfico da distribuição de Poisson para detecção de baixo número de cópias na PCR em tempo real	

## 1. Introdução

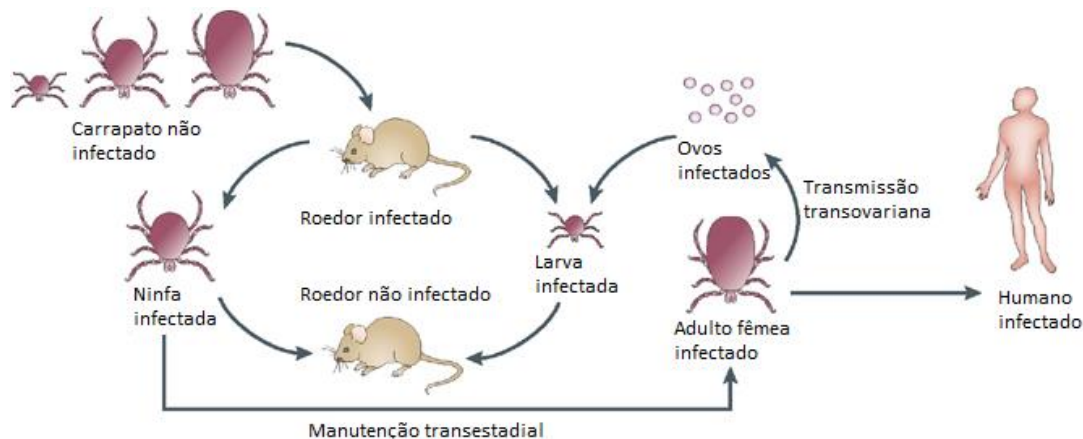
A Febre Maculosa é uma doença potencialmente fatal causada por riquetsias do Grupo Febre Maculosa (GFM).

Riquetsias são  $\alpha$ -proteobacterias pertencentes ao gênero *Rickettsia*, família *Rickettsiaceae* e ordem *Rickettsiales*. A classificação das riquetsias baseadas na análise completa dos genomas dividem as espécies do gênero *Rickettsia* em quatro grupos: Grupo Febre Maculosa (*R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. parkeri*, e outras 30 espécies); Grupo Tifo (*R. prowazekii* e *R. typhi*); Grupo Ancestral (*R. bellii* e *R. canadensis*) e Grupo de Transição (*R. akari*, *R. australis* e *R. felis*) (MANSUETO, *et al.*, 2012). No GFM estão as riquetsias de maior patogenicidade ao homem, destacando-se entre elas a *R. rickettsii* e *R. conorii*.

Trata-se de bactérias intracelulares obrigatórias, de tamanho pequeno (0,3-1,0  $\mu\text{m}$ ), pleomórficas, geralmente cocobacilos. Assemelham-se as bactérias Gram negativas quanto à composição da parede celular contendo peptidoglicanos e lipopolissacarídeos (LPS) e apresentam tropismo por células endoteliais humanas.

As riquetsias GFM são mantidas na natureza pela transmissão transovariana e perpetuação transestadial em carrapatos e transmissão horizontal para carrapatos não infectados que se alimentam de roedores e outros animais com riquetsemia (**Figura 1**) (WALKER e ISMAIL, 2008).

No Brasil, a capivara tem um papel importante como amplificador e disseminador da riquetsia entre os carrapatos (Souza, *et al.*, 2009). A população de capivaras tem se expandido no sudeste do Brasil devido à diminuição de predadores naturais, proibição da caça, alta taxa de reprodução e expansão da atividade agrícola provendo alimento a esses roedores e fazendo com que os vetores infectados se aproximem cada vez mais do homem. Este, por sua vez, não participa ativamente do ciclo epidemiológico das riquetsias, sua infecção ocorre acidentalmente através da exposição geralmente ocupacional ou recreativa ao carrapato infectado (SZABÓ, *et al.*, 2013).



**Figura 1. Ciclo de vida das riquetsias transmitidas por carrapatos.** Riquetsias do GFM são mantidas na natureza por transmissão transovariana, transtadiária e transmissão horizontal para carrapatos não infectados que se alimentam de roedores e outros animais com riquetsemia. Fonte: WALKER e ISMAIL, 2008. O homem não faz parte do ciclo das riquetsias do GFM e pode se infectar pela picada do carrapato infectado nos estágios de larva, ninfa e adulto.

As riquetsias são capazes de infectar e se replicar *in vitro* em diferentes tipos celulares, porém *in vivo* tanto em humanos como em modelos animais de infecção, o patógeno invade e se prolifera dentro de células endoteliais vasculares, sendo os vasos de pequeno e médio calibre os principais alvos. Em menor proporção infecta também células perivasculares como monócitos, macrófagos e hepatócitos, disseminando a infecção para todo o sistema vascular (MANSUETO, *et al.*, 2012).

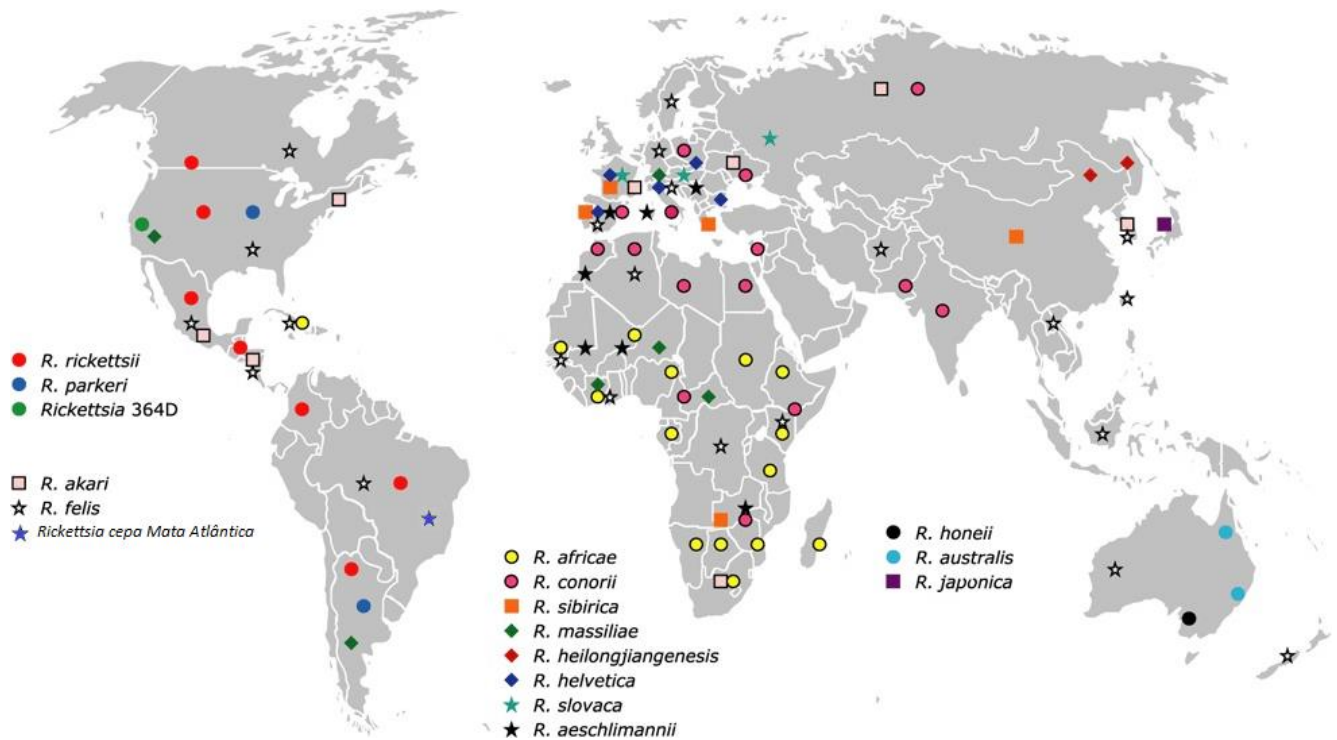
As lesões no endotélio e subsequente disfunção e ativação endotelial são seguidas por resposta inflamatória de fase aguda, alteração na coagulação, produção e liberação de citocinas e moléculas de adesão celular, desregulação imunitária transiente caracterizada pela diminuição da circulação de linfócitos TCD4+ periféricos e infiltração perivascular por linfócitos T CD4 e CD8, células B e macrófagos. A vasculite riquetsial se caracteriza pelo conjunto destes mecanismos de ação (MANSUETO, *et al.*, 2012).

Na Europa as riquetsioses transmitidas por carrapato são causadas por várias espécies de riquetsias e apresentam uma grande variedade de manifestações clínicas. A riquetsiose mais importante com relação ao potencial de letalidade é a Febre Maculosa do Mediterrâneo, causada pela



*Rickettsia conorii* e transmitida principalmente pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. O período de incubação é de 7 dias (4 a 21 dias) e há formação de escara na região da picada do carrapato em mais do que 72% dos casos. Febre aguda está presente em todos os casos sendo acompanhada por calafrios, cefaleia, fotofobia, artralgia, dor muscular, etc. Após 3 a 5 dias de evolução ocorre o exantema maculopapular frequentemente encontrado nas extremidades, na palma das mãos e planta dos pés, mas pode ser encontrado no tronco, com menor frequência. Na maioria dos casos há evolução lenta com recuperação do paciente, porém há registros de casos fatais devido a complicações da vasculite grave. No Laboratório de Riquetsias do IAL foi identificado e caracterizado *R. conorii* em um caso fatal de Febre Maculosa do Mediterrâneo em um viajante originário de Portugal atendido no HC-UNICAMP (GEHRKE, *et al.*, 2013).

Outras riquetsioses transmitidas por carrapatos que ocorrem na Europa, classificadas pela apresentação clínica são: riquetsiose associada à linfangite (*LAR*), causada pela *R. sibirica mongolitimonae*, é caracterizada por febre, exantema maculopapular, linfonodos infartados e múltiplas escaras, etc, sem casos fatais até o momento. Há ocorrência desta riquetsiose na França, Grécia, Portugal e Espanha. Diferentes espécies de riquetsias (*R. slovacica*, *R. raoultii*, *R. rioja*) estão associadas à mesma apresentação clínica, com algumas variações: linfadenopatia transmitida por carrapato (*TIBOLA*), linfadenopatia, eritema e necrose causada por *Dermacentor* (*DEBONEL*), linfadenopatia com escara do couro cabeludo e pescoço (*SENLAT*). Outras riquetsioses detectadas na Europa de menor ocorrência são causadas pela *R. helvetica*, *R. aeschlimannii*, *R. massiliae* e *R. monocensis* e provocam manifestações clínicas semelhantes à Febre Maculosa do Mediterrâneo (*MSF-like*). Frequentemente também são diagnosticados na Europa a febre africana por picada de carrapato (*ATBF*), causada pela *R. africae* de pacientes que retornaram de regiões endêmicas (OTEO e PORTILLO, 2012) (**Figura 2**).



**Figura 2.** Distribuição geográfica dos patógenos riquetsiais do Grupo da Febre Maculosa conhecidos (WOOD e ARTSOB, 2012), com modificações segundo SZABÓ, *et al.* (2013): inclusão da *Rickettsia* cepa Mata Atlântica .

Nas Américas a espécie de riquetsia do GFM mais importante para saúde pública é *Rickettsia rickettsii*, sendo a principal incriminada nos casos fatais. Casos de riquetsiose por *R. rickettsii* ocorrem de forma endêmica no Canadá, Estados Unidos, México, América Central, Brasil, Colômbia (WALKER, 1998). No Brasil, o agente etiológico da Febre Maculosa isolado em cultura de células a partir de amostras biológicas de humanos, sendo 2 casos graves e 7 casos fatais caracterizado como *R. rickettsii* com sequenciamento gênico mostrando de 100% identidade com outros isolados do Brasil, Costa Rica e Colômbia (OGRZEWALSKA, *et al.*, 2011).

No Brasil, esta riquetsiose é conhecida como Febre Maculosa Brasileira (FMB) e é transmitida ao homem por carrapatos do gênero *Amblyomma*, sendo *A. cajennense* e o *A. aureolatum* as principais espécies de carrapatos associados à transmissão da *R. rickettsii* (SZABÓ, *et al.*, 2013). A FMB constitui um problema de saúde pública devido à alta letalidade, ocorrendo em focos naturais em algumas regiões, onde

notificações de casos esporádicos e pequenos surtos epidêmicos são continuamente relatados (KATZ, *et al.* 2009).

Tendo em vista a capacidade das riquetsias de infectar células endoteliais de todo o organismo, levando a um processo de vasculite disseminada, diferentes manifestações clínicas são frequentemente observadas com acometimento cutâneo, musculoesquelético, cardíaco, pulmonar, gastrintestinal, renal e neurológico. Dos casos sintomáticos, a febre é uma constante e, frequentemente é a manifestação clínica inicial. Durante o curso da doença, logo no início, além da febre surgem cefaléia intensa, mialgia, artralgia, astenia, inapetência, dor abdominal, náusea e vômito. Diante da inespecificidade do quadro clínico inicial, tanto a FMB quanto a Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (como é chamada nos EUA) são confundidas frequentemente com um grande número de outras manifestações como: dengue, leptospirose, doença meningocócica, rubéola, entre outras.

No Brasil, após um período de quatro décadas praticamente sem notificação de casos, observou-se reemergência da doença, provavelmente como resultado de alterações ambientais provocadas pelo homem e da melhora da capacidade diagnóstica.

Casos ocorreram em São Paulo (MELLES *et al.*, 1999, LEMOS, *et al.*, 2001) e Minas Gerais (GALVÃO, *et al.*, 2002, GALVÃO, *et al.*, 2005, LEMOS, *et al.*, 2001). Foram registrados 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 São Paulo, 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 1985, no município de Pedreira, SP, foram notificados os primeiros casos suspeitos, porém sem confirmação laboratorial (DEL GUERCIO, *et al.* 1997).

No período de 1985 a 2000, observou-se um aumento gradativo de notificações de casos suspeitos em vários municípios daquela região (LIMA *et al.*, 2001), com um número de óbitos significativo.

Em outubro de 2001, conforme Portaria do Ministério da Saúde 1943, de 18/10/01, a qual redefiniu a relação de doenças de notificação compulsória para todo o território nacional, a FM foi incluída na lista dos agravos de notificação (BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n 1943, de 18 de outubro de 2001).

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 e que alberga um antigo foco da doença (MELLES *et al.*, 1992), foram registrados quatro óbitos por FMB, provavelmente transmitida por *Amblyomma aureolatum* (INFORME TÉCNICO, 2011).

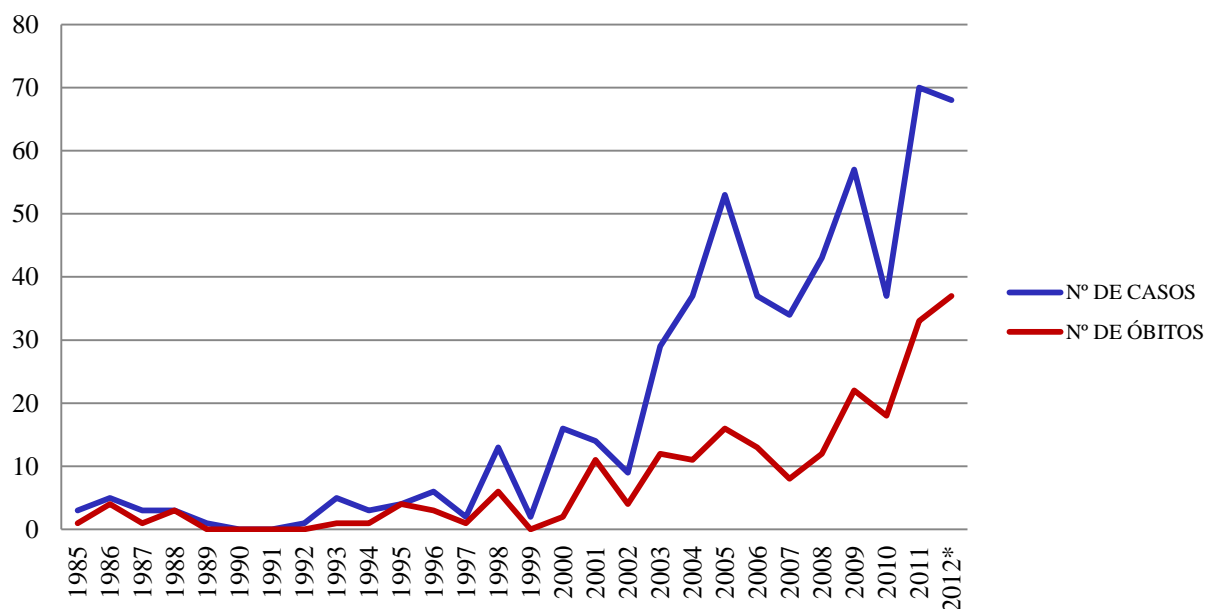
Em setembro de 2002, o óbito de uma criança no campus da ESALQ/USP em Piracicaba e o registro de um caso em Ribeirão Pires em abril de 2003, ambos com confirmação laboratorial pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo indicaram a existência de focos nessa região (NASCIMENTO, 2003).

Em 2004 foram confirmados pelo Laboratório de Riquetsias do Instituto Adolfo Lutz 42 casos no Estado de São Paulo, sendo 11 fatais. A maior frequência da doença ocorreu na região de Campinas, sendo sete dos casos somente no município de Vinhedo.

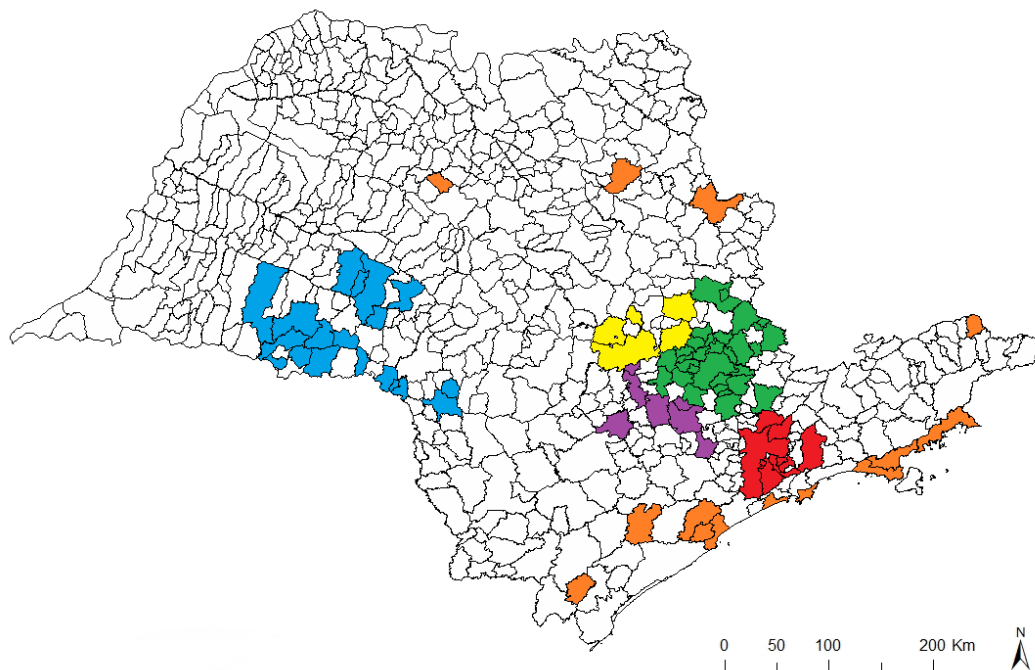
De acordo com o boletim da Vigilância Epidemiológica ([http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/cve\\_fmb.html](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/cve_fmb.html)) no Estado de São Paulo, de 1985 a 2012, já foram registrados 557 casos, sendo 225 casos fatais e letalidade média de 40%. No ano de 2011 foi registrado o maior número de casos de FMB (n=70) e, em 2012 foi maior número de óbitos pela doença (n=37), elevando a taxa de letalidade no ano para 54,4% (**Gráfico 1**) (até fevereiro de 2013, fonte: SINANNET/Zoonoses/CVE/CCD/SES-SP).

Em relação à procedência dos casos, a região de Campinas se mantém como principal região endêmica para FMB, com 53,6% dos casos, seguido pela Grande São Paulo com 17,5%, região de Piracicaba com 10,6% e região litorânea com cerca de 5%. Nos últimos anos novas áreas de transmissão da doença foram identificadas em municípios das regiões de Marília e Sorocaba, os quais, juntos são responsáveis por cerca de 10% dos casos de FMB no Estado de São Paulo (**Figura 3**).

**Gráfico 1.** Número de casos confirmados e óbitos por Febre Maculosa Brasileira no Estado de São Paulo de 1985 a 2012.



Fonte: CVE-SES-SP. Div de Zoonoses. \* dados provisórios em fevereiro de 2013



**Figura 3.** Região geográfica dos municípios com casos confirmados de FMB no Estado de São Paulo entre 1998 e 2012. Em verde está região de Campinas (IAL-Campinas); em amarelo está região de Piracicaba (IAL-Piracicaba); em lilás está região de Sorocaba (IAL-Sorocaba); em azul está a região de Marília (IAL-Marília); em vermelho está a região da Grande São Paulo; outros municípios em marrom. A lista dos municípios está no anexo III. Fonte: CVE-SES-SP. Div de Zoonoses. Dados provisórios em fevereiro de 2013.

Esses dados epidemiológicos indicam que os focos da doença no Estado de São Paulo continuam ativos, sendo preocupante o número de vítimas fatais. O número de suspeitas clínicas da doença também aumentou de 400 em 2004, para quase 2000 pedidos/ano de exame para diagnóstico da FMB no Estado de São Paulo nos anos seguintes (Fonte: registros do laboratório de referência de São Paulo – IAL), evidenciando aumento na vigilância da doença durante assistência ao paciente nas regiões endêmicas.

Enquanto no Estado de São Paulo a FMB está frequentemente associada a um quadro clínico grave, de evolução rápida com manifestações hemodinâmicas e falência múltipla dos órgãos, no Estado de Santa Catarina, em 2003 foi confirmado pela sorologia para GFM (RIFI) o primeiro caso da doença com evolução benigna, sendo seguido por muitos outros casos semelhantes notificados. ANGERAMI, *et al.* (2009) descreveram características clínicas e evolução dos quadros, comparando a casos de FMB no Estado de São Paulo e Santa Catarina. Entre as diferenças clínicas

mais marcantes estão: alta frequência de linfadenopatia e evolução benigna sem registro de caso fatal em Santa Catarina. Essas características são semelhantes às riquetsioses que ocorrem na Europa, conhecidas como *LAR*, e são causadas por outras *Rickettsias* do GFM, não *R. rickettsii* ou *R. conorii*. Em 2010 SPOLIDORIO, *et al.* registraram um caso de riquetsiose com essas características em Peruíbe/SP, onde o agente foi identificado por técnicas moleculares a partir de lesão cutânea, como uma nova cepa do GFM filogeneticamente próximas à *Rickettsia africae*, *R. parkeri*, e *R. sibirica* (SPOLIDORIO, *et al.*, 2010). Posteriormente, a mesma cepa, foi identificada em um caso na Bahia, também a partir de lesão cutânea (SILVA, *et al.*, 2011). Inicialmente denominada *R. parkeri*-like, também foi identificada em carrapatos *Amblyomma ovale* em regiões da Mata Atlântica quando foi então denominada de *Rickettsia* cepa Mata Atlantica (SZABÓ, *et al.*, 2013). É provável que existam outros casos desta riquetsiose no Brasil, porém o diagnóstico sorológico não permite diferenciação entre as riquetsias do GFM.

Atualmente, no Brasil, o diagnóstico laboratorial em humanos, para riquetsias GFM está sob a responsabilidade de três laboratórios integrantes da Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Epidemiológica das Riquetsioses: Fundação Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ-RJ, como Laboratório de Referência Nacional e; Instituto Adolfo Lutz/IAL – SP e Instituto Ezequiel Dias – MG, como Laboratórios de Referência Regional (BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n 210, de 12 de setembro de 2002).

O Instituto Adolfo Lutz é o principal Laboratório de Saúde Pública no Estado de São Paulo. Sua principal missão é contribuir no planejamento das ações de Vigilância Epidemiológica, Sanitária e Ambiental para prevenção, controle e eliminação de doenças e agravos de interesse em Saúde Pública. O instituto investe em ensaios de alta complexidade e pesquisa científica e de inovação tecnológica de interesse em saúde pública. Uma das principais vertentes é o aprimoramento de técnicas diagnósticas voltadas para doenças de notificação compulsória.

No IAL, o Laboratório de Riquetsias (LRIAL) realiza diagnóstico das riquetsioses desde 1985. É integrante da Rede dos Centros Colaboradores da Organização Pan-Americana da Saúde, da Organização Mundial da Saúde –OPAS/OMS, no Brasil e, da Rede de Laboratórios de Vigilância Epidemiológica classificado como Referência para Riquetsioses, segundo a Portaria 70/2004 (BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n 70, de 23 de dezembro de 2004).

O LRIAL é responsável pelo diagnóstico laboratorial das riquetsioses humanas nas principais regiões endêmicas do Brasil que estão localizadas no Estado de São Paulo e, funciona como laboratório de apoio no diagnóstico das riquetsioses para os Laboratórios Centrais (LACEN) dos Estados do Paraná, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul.

No LRIAL são realizados exames para o diagnóstico da FM através de métodos indiretos e diretos.

Nos métodos indiretos, a sorologia por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) pesquisa anticorpos específicos para riquetsias do GFM, corresponde a cerca de 80% das atividades de rotina do laboratório. No LRIAL utilizam-se antígenos riquetsiais a partir de cultura de *Rickettsia rickettsii* comerciais ou produzidos *in house*. Além da RIFI para riquetsias do GFM, no LRIAL estão disponíveis antígenos para detecção de outras riquetsioses como Tifo Murino, Tifo Epidêmico, Febre Q, Bartoneloses e Erliquioses.

Na RIFI para GFM riquetsias de uma cultura concentrada são impregnadas na lâmina servindo como matriz natural, onde proteínas antigênicas de superfície funcionam como antígenos funcionais para a reação antígeno anticorpo. Os anticorpos presentes no soro do paciente com FMB reagem com os antígenos riquetsiais de superfície permanecendo neles fixados, a revelação é feita indiretamente empregando-se anticorpos anti-humanos marcados com fluoresceína produzidos comercialmente, conhecidos como conjugado fluorescente. O conjugado fluorescente reagirá com os anticorpos do soro do paciente fixados na lâmina onde também se



fixará formando uma reação tipo sanduíche (PHILLIP, *et al.*, 1978; LA SCOLA e RAOULT, 1997). Existem conjugados comerciais que detectam classes específicas de anticorpos, os mais utilizados são os anti-IgG e anti-IgM para detecção específica de IgG e IgM respectivamente, porém existem também os conjugados anti-Ig humano total, os quais detectam IgG, IgM e IgA não sendo possível a distinção entre eles.

Anticorpos da classe IgM são menos específicos que os do tipo IgG, embora apareçam primeiro. Os resultados positivos para IgM em baixos títulos podem refletir reação inespecífica ou cruzada com outras doenças (dengue, leptospirose, entre outros) e, portanto devem ser analisados com critério. Já os anticorpos do tipo IgG aparecem pouco tempo depois dos IgM e são mais específicos, embora também não seja possível excluir a possibilidade de reação inespecífica quando título for baixo em amostra única de soro.

O método da imunofluorescência indireta é sensível para identificar a presença de anticorpos no soro (84 a 100%), porém deve-se considerar o período de janela imunológica, onde os títulos de anticorpos ainda não atingiram concentrações detectáveis pela RIFI, esse período varia entre o dia da picada do carrapato infectado até 7-10 dias após o surgimento dos primeiros sintomas (PHILLIP, *et al.*, 1976 e PHILLIP, *et al.*, 1978; LA SCOLA e RAOULT, 1997; NASCIMENTO e COLOMBO, 2004).

O diagnóstico laboratorial da sorologia pela RIFI é estabelecido pela detecção de anticorpos específicos no soro de pacientes que aumentam em título com a evolução da doença. Para tanto, a reação deve ser realizada em amostras pareadas. A primeira amostra de soro deve ser coletada nos primeiros dias da doença (fase aguda) e a segunda amostra 15 a 21 dias após a coleta da 1ª amostra (SILVA *et al.*, 2010). A observação da soroconversão com elevação maior ou igual a 4 títulos garante um resultado confiável, uma vez que há associação entre a elevação do título de anticorpos específicos com sintomas compatíveis com FMB ([http://www.cdc.gov/ticks/diseases/rocky\\_mountain\\_spotted\\_fever/](http://www.cdc.gov/ticks/diseases/rocky_mountain_spotted_fever/)).

Porém, existe um número significativo de casos da doença no Estado de São Paulo que evolui clinicamente de forma grave e rápida com ocorrência de óbito em até 10 dias após o aparecimento dos sintomas, não sendo possível a coleta da segunda amostra biológica. Nesses casos, no LRIAL realiza-se o teste sorológico em amostra única de sangue, com pesquisa de IgG e IgM específicos para GFM, sendo títulos maiores do que 128 considerados casos prováveis. A conclusão desses casos depende da análise crítica dos dados clínicos, epidemiológicos, juntamente com outros resultados laboratoriais, e o resultado da pesquisa para outros agentes.

Entre os métodos diretos para detecção etiológica da FM estão o isolamento em cultura de células realizado no LRIAL e a análise histopatológica e imunohistoquímica realizada no Centro de Patologia do IAL. Os métodos moleculares estão em fase inicial de introdução na rotina diagnóstica das riquetsioses no LRIAL.

O isolamento da riquetsia em cultura celular é um procedimento laborioso que exige alta qualificação técnica e laboratório nível três de segurança microbiológica para manipulação do agente viável. Devido a essas dificuldades são poucos os laboratórios que disponibilizam esse serviço para o diagnóstico das riquetsias. Como se trata de uma bactéria intracelular, a amostra clínica deve ser inoculada em células suscetíveis e o agente cresce em co-cultivo. A centrifugação diferenciada para as riquetsias aumentando a eficiência da inoculação foi incorporada na metodologia sendo denominada *shell vial* (MARRERO e RAOULT., 1989, MELLES *et al.*,1992 e 1999)

O isolamento de riquetsias é extremamente útil nos casos mais graves, quando a coleta é feita na fase aguda da doença, embora não haja anticorpos detectáveis, há intensa riquetsemia, sendo grandes as possibilidades de isolamento da bactéria (QUESADA *et al.*,2006). Além da identificação do agente para o diagnóstico, o isolamento de riquetsias em cultura celular possibilita estudos posteriores de caracterização molecular dos isolados e produção de antígeno para RIFI.

A experiência adquirida no Laboratório de Riquetsias do IAL mostrou que nos casos de óbito por FMB, em pelo menos 60% dos casos confirmados pelo isolamento da bactéria, a sorologia em amostra única colhida na fase aguda apresentou resultado negativo.

Em apenas 10-20% dos casos fatais há o envio de amostra adequada para o teste de isolamento bacteriano para riquetsias GFM, muitas unidades requisitantes não possuem condições adequadas para a coleta e envio de amostras para realização do isolamento em cultura de células, limitando a realização deste exame.

O resultado do isolamento é conclusivo, quando positivo; porém quando negativo possui baixo valor diagnóstico, pois uma série de fatores pode interferir no processo, como o uso de antibiótico antes da coleta, as condições de esterilidade da coleta, armazenamento e transporte da amostra.

Nos casos de óbito, quando isolamento resultar em negativo, ou quando não for realizado, o diagnóstico laboratorial da FMB baseado somente na sorologia em amostra única pode tornar-se impreciso e não fidedigno.

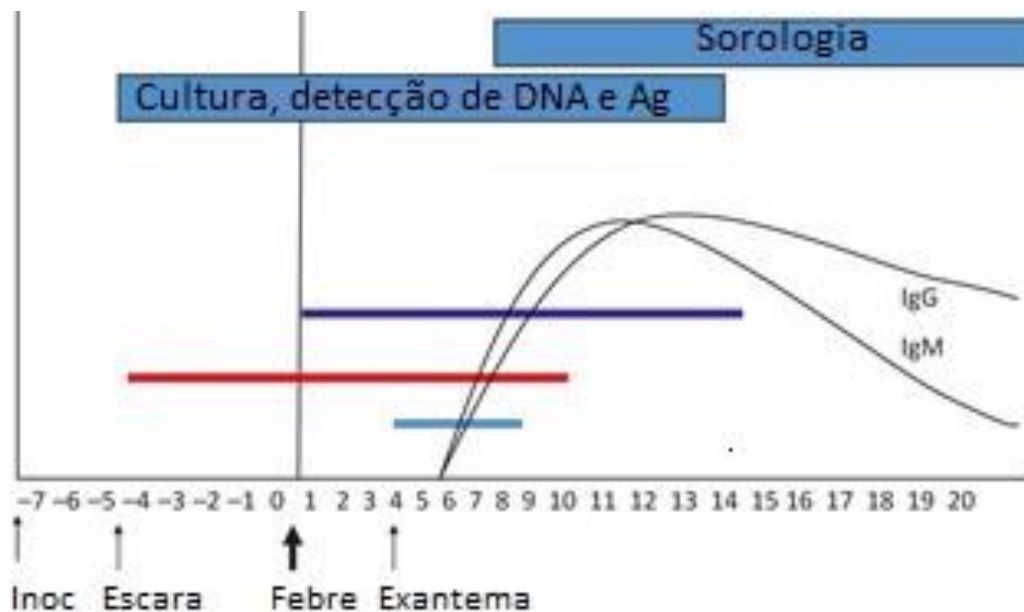
No Centro de Patologia do IAL, a histopatologia e imunohistoquímica são realizadas em amostras de tecidos obtidas em biópsia de lesões de pele de pacientes infectados ou em material de necropsia, como fragmentos de pulmão, fígado, baço, coração, rim, músculo e cérebro, fixados em formalina a 10% e incluídos em parafina. Os achados histopatológicos evidenciados são associados à lesão endotelial causada pelas riquetsias, com espectro variando desde infiltrado linfomononuclear até quadros de intensa vasculite leucocitoclástica. Essa técnica apresenta elevada sensibilidade e especificidade e seus resultados consistem em demonstração positiva de antígenos riquetsiais em células endoteliais de amostras de biópsia ou autopsia (INFORME TÉCNICO, 2011).

Os laboratórios de referência para o diagnóstico de riquetsioses no Brasil têm utilizado os métodos moleculares de maneira ainda limitada, restringindo-se principalmente aos projetos de pesquisa (HORTA *et al.*,

2004, LABRUNA *et al.*, 2004, NASCIMENTO, 2003 e NASCIMENTO, *et al.*, 2005) ou confirmação de alguns casos (SPOLIDORIO, *et al.*, 2010, FAVACHO, *et al.*, 2011). Os resultados obtidos são bastante estimulantes, porém sua aplicação no diagnóstico de riquetsioses na rede pública de saúde exige alto investimento financeiro e protocolos de referência para os laboratórios da rede.

Embora tenha perspectivas promissoras, o diagnóstico molecular da FMB recebe algumas críticas devido à possibilidade de resultados falso-negativos (KIDD, *et al.*, 2008). Assim como todos os outros métodos que detectam o agente etiológico, tais como isolamento e a imunohistoquímica, o curto período de bacteremia é uma das principais razões do resultado falso negativo (SOUZA, *et al.*, 2009). Pode-se inferir que, quanto mais precoce a coleta da amostra biológica maiores são as possibilidades de se detectar o agente diretamente e menores são as possibilidades de se detectar os anticorpos específicos, por outro lado, quanto mais tardia, menores as possibilidades de se detectar o agente diretamente, porém maiores as possibilidades de se detectar anticorpos no soro (CHOI, *et al.*, 2005). Na **Figura 4** pode se observar a relação entre os marcadores sorológicos e etiológicos no curso das riquetsioses humanas (RICHARDS, 2012)

Outros fatores associados ao resultado falso negativo seriam a possível presença de inibidores da reação de PCR e, a baixa recuperação de DNA do agente infeccioso no processo de extração devido à resistência das diferentes matrizes biológicas (soro, coágulo, amostras de tecido). A antibioticoterapia específica há mais de 24 horas antes da coleta da amostra biológica para o exame também favorece o resultado falso negativo.



**Figura 4.** Curso temporal dos marcadores gerais das doenças riquetsiais (Febre Maculosa e outras riquetsioses humanas) em relação à detecção e diagnóstico. “Inoc” se refere na figura ao tempo que o agente riquetsial é inoculado no hospedeiro através do vetor artrópode. Escara (barra vermelha) se refere à lesão no local da inoculação, no qual aparece dentro de poucos dias a partir da picada do artrópode vetor e em algumas riquetsioses evolui com eritema e placa endurecida e escara central. “Febre” (barra azul escuro) se refere ao tempo para o aparecimento da febre e outros sintomas da doença. “Exantema” (barra azul claro) se refere ao aparecimento das máculas papulares, papulovesículas e/ou petequias, aproximadamente 3-5 dias após o aparecimento dos sintomas até 5-8 dias do curso da doença. Imunoglobulina (Ig) M e G aparecem em níveis detectáveis em 5-10 dias após a apresentação da doença permanece por meses a anos, respectivamente. Cultura de riquetsias e detecção de DNA e Antígenos (Ag) (bloco azul) podem ser aplicadas antes da apresentação da doença se uma escara for identificada, mas geralmente ocorre imediatamente após a apresentação da doença até uma a duas semanas posteriores. Os ensaios sorológicos (bloco azul) pode detectar IgM ou IgG ou ambos cerca de 5-10 dias após a apresentação da doença. Para a sorologia, uma amostra deveria ser colhida na fase aguda da doença e outra na fase de convalescença de 10-20 dias de evolução. A soroconversão ou aumento de quatro vezes o título é uma indicação de que ocorreu uma doença riquetsial (RICHARDS, 2012, com modificações)

Não apenas a precocidade da coleta da amostra pode interferir na sensibilidade da detecção etiológica do agente, mas também a gravidade dos casos (LEITNER, *et al*, 2002). Quanto maior a gravidade do caso, maior a probabilidade de se detectar o agente. Por se tratar de bactéria intracelular obrigatória, a probabilidade de ser detectada em amostras periféricas como sangue/soro será maior quanto maior a extensão da lesão celular (vasculite), o que ocorre frequentemente nos casos fatais FMB.

Em 1989, TZIANABOS *et al.* detectaram riquetsias GFM em amostras clínicas humanas (coágulo sanguíneo) utilizando apenas os iniciadores TZ-

15 e TZ-16 empregando PCR convencional e obtiveram resultados bastante interessantes: dos nove casos confirmados pela PCR, sete (78%) eram provenientes de casos graves que evoluíram para óbito.

Poucos estudos utilizaram o soro como amostra clínica para pesquisa de riquetsias GFM em humanos, utilizando ferramentas moleculares (CHOI, *et al.*, 2005, LEITNER, *et al.*, 2002), os melhores resultados foram obtidos de amostras de casos que evoluíram para o óbito (casos graves). Em trabalho recente do nosso grupo de pesquisa a *Nested* PCR foi utilizada em 50 amostras de soro de pacientes que evoluíram para o óbito; 14 casos foram detectados exclusivamente pela *Nested* PCR e a maior sensibilidade (25 casos) foi obtida quando os resultados da *Nested* PCR foram analisados complementando os da sorologia e do isolamento para FMB (NASCIMENTO *et al.*, 2009).

A PCR em tempo real, idealizada para análise quantitativa de alvos gênicos, vêm cada vez mais demonstrando seu potencial na pesquisa qualitativa de agentes infecciosos. No IAL, em 2009, seguindo as recomendações do CDC/USA, a PCR em tempo real foi implementada para o diagnóstico do vírus Influenza AH1N1 pandêmico, onde pode ser demonstrada sua capacidade analítica. Desde então, houve um incentivo institucional para a expansão da utilização desta metodologia para pesquisa qualitativa de outros agentes infecciosos.

Em relação à PCR convencional, além da alta capacidade analítica, a PCR em tempo real para pesquisa qualitativa de agentes apresenta vantagens com menor risco de contaminação devido à eliminação dos processos pós-PCR e diminuição significativa da subjetividade da leitura dos resultados, uma vez que é feita em tempo real e através do programa específico do aparelho de PCR quantitativa.

A praticidade, com resultado em única reação, e protocolos mais rápidos devido às regiões gênicas alvo serem menores (70-150 pb) favorecendo maior eficiência na amplificação. A eliminação da eletroforese para identificação dos fragmentos é um importante fator que colabora para rapidez no processo.

Como a detecção dos fragmentos amplificados na PCR em tempo real ocorre durante a reação e não no final como no PCR convencional e *Nested*, a cinética da reação pode ser monitorada, e o desempenho da reação pode ser calculado, colaborando com o monitoramento da especificidade da reação e controle de qualidade na análise das amostras. A detecção em tempo real fornece um valor quantitativo a cada amostra analisada possibilitando estabelecer uma relação quantitativa entre elas. Os monitoramentos da estabilidade do controle positivo, da eficiência da extração e do desempenho geral da corrida podem ser registrados em cartas controles de dentro de um programa de qualidade.

Nos últimos anos, a PCR em tempo real para o diagnóstico de riquetsioses humanas têm sido cada vez mais utilizada pelos Laboratórios de Referência nos EUA e Europa (EREMEEVA, *et al.*, 2003, KATO, *et al.*, 2012, ANGELAKIS, *et al.*, 2012, RENVOISÉ, *et al.*, 2012).

A proposta deste estudo foi verificar o desempenho de dois protocolos de PCR em tempo real para detecção de riquetsias, os quais variam em relação à região gênica alvo e ao mecanismo de sinalização da amplificação (EREMEEVA, *et al.*, 2003 e LABRUNA, *et al.*, 2004).

Um dos protocolos de PCR em tempo real para detecção de riquetsias GFM foi desenvolvido pelo grupo do CDC-EUA (EREMEEVA *et al.*, 2003) para quantificação de riquetsias em cultura celular. Baseia-se na amplificação de um fragmento de 154 pb da região gênica que codifica proteína de membrana OmpA e possui sensibilidade de até 5 cópias/reação utilizando como *template* plasmídeo clonado. Estudos preliminares (SANTOS, *et al.*, 2011) empregando 50 amostras de soro mostram que a sensibilidade deste método é compatível com a *Nested* PCR, ou seja em uma única reação de qPCR a sensibilidade é 100 vezes maior do que na PCR convencional (CHOI *et al.*, 2005).

No protocolo de qPCR proposto por EREMEEVA *et al.*, (2003) a amplificação é sinalizada por um agente intercalante de fita dupla de DNA chamado SYBR Green, sendo portanto uma reação de menor custo em relação ao uso de *probe* fluorescente, porém há necessidade da análise da

curva de dissociação (*melting*) para confirmação da amplificação específica. Apesar deste método não utilizar uma marcação específica, os iniciadores (*primers*) flanqueiam uma região gênica polimórfica dentro do GFM e as amostras com curva de *melting* deslocadas em relação à *R. rickettsii* podem ser encaminhadas para sequenciamento gênico, possibilitando a identificação de algumas espécie. Até o momento, no Brasil, as riquetsias isoladas de casos humanos graves de FMB têm sido identificadas como *R. rickettsii* após sequenciamento gênico (OGRZEWALSKA, *et al.*, 2011), porém o monitoramento do agente etiológico é importante para vigilância epidemiológica da doença.

O outro protocolo de PCR em tempo real a ser avaliado foi idealizado por LABRUNA, *et al.* (2004) para pesquisa de riquetsias em vetores; tem como região alvo o gene da Citrato Sintase (*gltA*) e é capaz de detectar por meio de sonda de hidrólise marcada com fluoróforo (TaqMan®) um fragmento de 147 pb presente constitutivamente no Gênero *Rickettsia* (*Rickettsia* spp). A sensibilidade da técnica é de até 1 cópia para *Rickettsia rickettsii*, utilizando *template* de plasmídio clonado.

Neste estudo a PCR em tempo real, representada pelos protocolos de EREMEEVA, *et al.* (2003) e LABRUNA, *et al.* (2004), foi avaliada como ferramenta diagnóstica para detecção de riquetsias em amostras biológicas encaminhadas ao LRIAL para o diagnóstico laboratorial da FMB.



## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar as aplicações da PCR em tempo real no diagnóstico laboratorial da FMB, identificando abrangência e limitações técnicas, visando estabelecer protocolos para sua incorporação na rotina diagnóstica.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Validar os protocolos de PCR em tempo real *gltA-TaqMan®* e *ompA-SYBR*
- Avaliar a especificidade e sensibilidade analítica dos protocolos.
- Aplicar os protocolos nas amostras biológicas encaminhadas ao LRIAL.
- Analisar os resultados obtidos nos diferentes grupos de estudo: pacientes com suspeita clínica de FMB que evoluíram para o óbito, pacientes positivos e negativos confirmados pela sorologia para FMB, pela RIFI em amostras pareadas.
- Correlacionar os resultados obtidos empregando a PCR em tempo real com outros dados laboratoriais.
- Definir as aplicações e limitações da PCR em tempo real no diagnóstico laboratorial da FMB.

### 3. Justificativa

A Febre Maculosa Brasileira faz parte do diagnóstico diferencial nas Síndromes Febris Hemorrágicas Agudas, porém o diagnóstico sorológico na fase aguda da doença é um desafio para o laboratório, dado o aparecimento tardio dos anticorpos específicos, em níveis detectáveis no sangue. O isolamento de riquetsias em cultura celular, indicado especialmente para o diagnóstico em casos graves, é frequentemente dificultado pela necessidade de condições especiais de transporte e armazenamento para manter a viabilidade da amostra clínica.

Em 1997 a técnica de PCR foi indicada como uma alternativa para o diagnóstico precoce da doença, possibilitando a detecção do agente infeccioso antes da soroconversão (LA SCOLA e RAOULT ,1997), porém a abrangência e limitações do seu uso para o diagnóstico em humanos ainda não estão definidos.

NASCIMENTO *et al*, (2009) utilizando a *Nested* PCR (*htrA*), pesquisaram riquetsias do GFM em 50 amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de FM, que evoluíram para o óbito. Nesse estudo, 14 casos foram detectados exclusivamente pela *Nested* PCR. Houve um aumento de 2,3 vezes na capacidade diagnóstica com a utilização da *Nested* PCR (de 11 positivos detectados pela sorologia e/ou isolamento, para 25, utilizando a *Nested* como metodologia complementar).

Estes dados preliminares registrados no LRIAL indicam que existem situações em que os exames laboratoriais de rotina podem ser insuficientes para conclusão dos casos de FMB, sendo necessária a busca de novas metodologias de avaliação diagnóstica, que possibilitem fornecer resultados com maior sensibilidade e especificidade, particularmente em casos fatais, quando as amostras são limitadas.

Neste trabalho, a abrangência e limitações da PCR em tempo real para o diagnóstico da FMB foram avaliados visando estabelecer protocolo(s) de aplicação do método passíveis de serem incorporados à rotina diagnóstica.

## **4. Casuística e Métodos:**

### **4.1. Casuística**

O grupo de estudo foi constituído por amostras biológicas de 539 pacientes que tiveram suspeita clínica de FMB selecionados entre os anos de 2005 a 2012 no LRIAL. Destes, 410 foram casos fatais, chamados neste estudo como grupo de óbitos e 129 não fatais.

Dos 129 não fatais, 84 tiveram o diagnóstico de FMB confirmado pela RIFI com soroconversão (elevação de 4 vezes o título de IgG) em amostras pareadas coletadas com intervalo de  $\geq 15$  dias e foram denominados de grupo de soroconversões. Neste grupo, 46 casos foram do Estado de São Paulo e 38 do Estado de Santa Catarina.

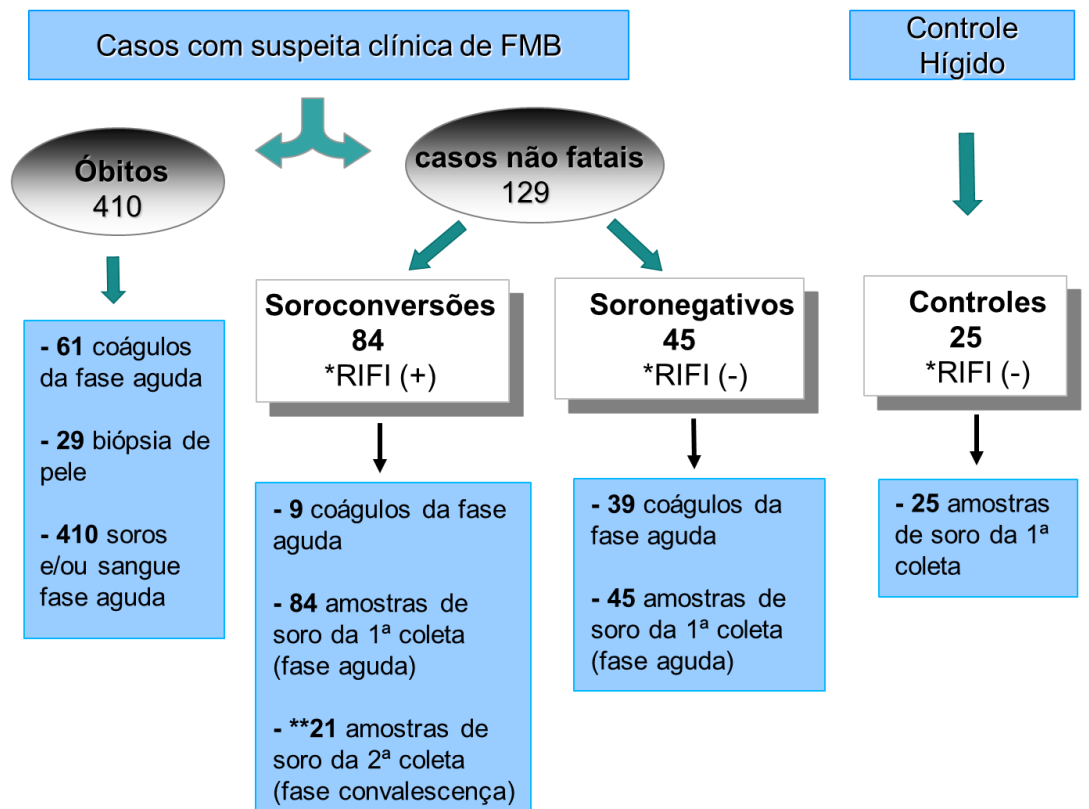
Ainda entre os não fatais, 45 tiveram a suspeita de FMB excluída com sorologia pela RIFI negativa em amostras pareadas com intervalo de  $\geq 15$  dias, sendo chamados neste estudo de grupo de soronegativos.

Um grupo de 25 indivíduos hígidos foi selecionado a partir de um estudo de vigilância soropidemiológica para FMB na região de Campinas, realizado em 2006 e foram denominados neste estudo de grupo de controles negativos.

### **4.2. Amostragem**

Neste estudo foram incluídas amostras de soro e, quando disponíveis, também foram analisadas amostras de sangue total, coágulo e/ou biópsias de lesão de pele.

Todas as amostras biológicas selecionadas da rotina diagnóstica do LRIAL incluídas neste estudo estão descritas no esquema a seguir:



\*RIFI em amostras pareadas com intervalo de coleta  $\geq 15$  dias

**Figura 5.** Fluxograma da casuística e amostragem, incluída no estudo das aplicações da PCR em tempo real no diagnóstico laboratorial da Febre Maculosa Brasileira, selecionados entre 2005 e 2012 no LRIAL. \*\*No grupo de soroconversões foi selecionada uma amostragem de 21 soros de fase de convalescença para avaliar as aplicações da qPCR para FMB nesse tipo de amostra biológica.

### 4.3. Aspectos Éticos

As amostras utilizadas neste estudo fazem parte do conjunto de amostras encaminhadas ao LRIAL para diagnóstico laboratorial de rotina para FM, a saber: sorologia para FM e isolamento de riquétsias do grupo da FM. Os resultados dos exames laboratoriais realizados na rotina foram liberados dentro do prazo previsto pela instituição, portanto os dados utilizados destes exames foram obtidos do banco do IAL, SIGH-IAL.

Os casos positivos detectados pela qPCR foram comunicados a Vigilância Epidemiológica da Febre Maculosa (CVE-SES-SP), uma vez que trata-se de doença de notificação compulsória.

Os dados sobre a identificação dos pacientes foram e continuam sendo mantidos em sigilo.

No presente estudo não há conflito de interesse por parte dos participantes.

Este projeto foi aprovado no Comitê de Ética do IAL com número de protocolo: 035/2011 e no Comitê Técnico Científico do IAL com número de registro 01D/2011.

#### **4.4. Métodos**

##### **4.4.1. Extração de ácido nucléico das amostras clínica**

Os ácidos nucléicos das amostras de soro foram extraídos utilizando o protocolo otimizado do kit *PureLink™ Viral RNA/DNA (Invitrogen®)* para rápida e eficiente purificação de ácido nucléico viral em amostras livres de célula. Utilizando microtubo estéril de 2,0 mL, em 200 µL de soro adicionou-se 200 µL de tampão fosfato (PBS pH=7,2), 400 µL do tampão de lise (incluso no kit) e 50 µL de proteinase K a 20,0 mg/mL e 5,6 µg de RNA Carregador (*Carrier*), seguido de incubação a 56°C por 30 min. Após o período de incubação, 500 µL de etanol absoluto foi adicionado. A mistura foi agitada no vortex e incubada por 5 min. Após centrifugação rápida (*spin*) foi adicionada à coluna de purificação do kit, seguido de centrifugação 6.800xg por 1 min. A coluna foi lavada 2 vezes, de acordo com o protocolo do fabricante. O ácido nucléico foi eluído da coluna com 40 µL de água estéril livre de RNase e DNase, após incubação por 1 min à TA e centrifugação a 14.000xg por 2 min. O material extraído foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

A extração do DNA das amostras de sangue foi realizada de acordo com o protocolo do kit *PureLink™ Genomic DNA (Invitrogen®)*. Brevemente, a 200 µL de sangue adicionou-se 20 µL de proteinase K a 17,8 mg/mL, 180 µL do tampão de digestão incluso no kit e misturou-se bem, seguindo incubação a 55°C por 30 min. Adicionou-se 400 µL do tampão de lise/ligação. A mistura foi agitada no vortex por 15 seg e 400 µL de etanol 96-100% foi adicionado. Após nova agitação no vortex por 15 seg a mistura foi adicionada na coluna de purificação e centrifugada a 10.000xg por 1 min

a TA, em duas etapas de 600 µL. A coluna foi lavada de acordo com o protocolo do fabricante. O DNA foi eluído com 40 µL do tampão de eluição do kit, após incubação por 1 min a TA e centrifugação a 14.000xg por 1 min. A solução contendo o DNA extraído foi armazenada a -20°C até o momento do uso.

As amostras de biópsia de lesão de pele foram processadas utilizando o kit *PureLink™ Genomic DNA (Invitrogen®)*. Das amostras de tecido foram utilizados alíquotas de cerca de 25-30 mg (aproximadamente 3 mm<sup>3</sup>), colhida com material estéril. As amostras de tecido foram maceradas em 200 µL do tampão de digestão do kit e incubadas para digestão com proteinase K do kit por 50 min a 55°C, seguindo então o protocolo recomendado no kit.

Das amostras de coágulo foram utilizadas alíquotas de 200 µL, as quais foram incubadas com 200 µL do tampão de digestão do kit por 40 min a 55 °C, com agitação no vortex a cada 10 min. Seguiu-se então o protocolo do kit *PureLink™ Genomic DNA (Invitrogen®)* mantendo as proporções de 1:1:1 dos reagentes amostra+ tampão de digestão: tampão de lise: etanol absoluto.

O produto das extrações das biópsias de lesão e coágulos foram eluídos em 60 µL do tampão de eluição e armazenado -20 °C até o momento do uso.

#### **4.4.2. PCR em tempo real para FMB**

As amostras extraídas foram submetidas a dois protocolos de PCR em tempo real para o diagnóstico da FMB para detecção de *Rickettsias* spp. Um protocolo de PCR em tempo real adicional para detecção de RNase P humana foi utilizado como controle interno endógeno do ensaio (**Tabela 1**).

O protocolo que, neste estudo, foi denominado *gltA-TaqMan®* utilizou os iniciadores CS-5 e CS-6 e foi planejado para amplificar um fragmento de 147 pb do gene da enzima citrato sintase (*gltA*) presente no Gênero *Rickettsia*. A *probe* do tipo *TaqMan®* foi marcada na região 5' terminal com a molécula sinalizadora 6-carboxifluoresceína (FAM) e na região 3' terminal com *Blackhole Quencher 1 (BHQ1)*. As reações foram desenvolvidas nos

equipamentos de PCR em tempo real 7300 da *Applied Biosystems* ou *Light Cycler 480 II* da Roche, com volume final de reação de 25  $\mu\text{L}$ , sendo 12,5  $\mu\text{L}$  de Master Mix (*SuperScript® III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System with ROX, Invitrogen®*), 0,5  $\mu\text{L}$  de cada um dos iniciadores a 25  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{L}$  de probe a 15  $\mu\text{M}$  e água grau pura para biologia molecular em quantidade suficiente para 20  $\mu\text{L}$ , e 5  $\mu\text{L}$  da solução contendo DNA extraído da amostra. As condições de ciclagem foram: 1 ciclo a 50°C por 10 min, e 95°C por 2 min, seguido de 45 ciclos de 15s a 95°C, 30s a 50°C e 30s a 60°C. Este protocolo foi planejado para detectar sinal de amplificação para todas as espécies de *Rickettsia*, incluindo *R. rickettsii*, *R. prowazekii*, *R. canadensis*, *R. akari*, *R. felis*, *R. montanensis* e *R. sibirica*. A sensibilidade deste método de acordo com a literatura é de 1 cópia de DNA para *R. rickettsii* a 100 cópias para *R. bellii* (LABRUNA, *et al.*, 2004).

O segundo protocolo de PCR em tempo real para detecção de *Rickettsia* spp avaliado neste estudo foi denominado *ompA*-SYBR. Idealizado por EREMEEVA, *et al.* (2003) é capaz de detectar especificamente riquetsias do Grupo da Febre Maculosa. Os iniciadores RR190.547F e RR190.701R (**Tabela 1**) foram desenhados para amplificar um fragmento de 154 pb do gene da proteína de membrana rOmpA de *Rickettsia rickettsii*, exclusiva do Grupo Febre Maculosa (nº de acesso no GenBank M31227.1). As reações foram desenvolvidas nos equipamentos de PCR em tempo real 7300 da *Applied Biosystems* ou *Light Cycler 480 II* da Roche, com volume final de reação de 25  $\mu\text{L}$ , utilizando-se os reagentes e o protocolo do Kit SYBR Green (SYBR Green Master Mix 2X, *Applied Biosystems*). A cada ensaio foi utilizado 5  $\mu\text{L}$  da solução de DNA extraída das amostras e 0,5  $\mu\text{L}$  de cada um dos iniciadores a 25  $\mu\text{M}$ . As condições de ciclagem foram: 1 ciclo de 50°C por 2 min e 95°C por 3 min, seguido de 45 ciclos de 20s a 95°C, 20s a 57°C e 65°C por 30s. Após a ciclagem, seguiu-se extensão final de 72°C por 5 min e curva de dissociação (*melting curve*) de acordo com o protocolo padrão (*default*) dos equipamentos. De acordo com EREMEEVA, *et al.*, 2003, este protocolo é capaz de detectar sinal de amplificação de 11 espécies de *Rickettsia* do GFM, incluindo *R. rickettsii*, *R. montanensis*, *R.*

*rhipicephali*, *R parkeri*, *R slocava*, *R africae*, *R sibirica*, *R honei*, isolado SFG 364-D, Astrakhan spotted fever A-1 e Israeli tick typhus CDC. A sensibilidade deste método de acordo com a literatura é de 5 cópias/reação utilizando controle clonado.

Para cada partida de reação de PCR em tempo real para detecção de *Rickettsia* spp foram utilizados 2 controles de reagentes e ambiente (NTC – *no template control*) e 4 controles positivos, sendo uma duplicata de concentração média (1:100) e outra de concentração baixa (1:1000) (PTC – *positive template control*).

Os controles positivos foram obtidos a partir de cepas de *Rickettsia rickettsii* isoladas de amostras clínicas de pacientes com FMB, as quais foram repicadas em cultura de células Vero, identificadas por Imunofluorescência indireta e, após extração de DNA foram submetidas a sequenciamento gênico das regiões *ompA*, *ompB* e *gltA* de acordo com REGNERY, *et al.* (1991), sendo caracterizadas como 100% idênticas a cepa *R. rickettsii* Taiaçu, previamente isolada de carrapatos *Amblyomma aureolatum*, no Brasil (OGRZEWALSKA, *et al.*, 2011).

Para avaliar a qualidade das amostras processadas com relação à recuperação do DNA extraído baseando-se no valor do CT e, à presença de possíveis inibidores da PCR, foi realizada uma PCR em tempo real de um controle interno endógeno cujo alvo foi a Rnase P humana seguindo o protocolo recomendado pelo CDC para detecção do vírus Influenza (*REF. # I-007-05*, e SHU, *et al.*, 2011). Na **Tabela 1** estão descritos os iniciadores utilizados e a sonda *TaqMan*® marcada na região 5´ terminal com a molécula sinalizadora 6-carboxifluoresceína (FAM) e na região 3´ terminal com *Blackhole Quencher 1* (BHQ1). O volume final de reação foi de 25 µL, sendo 12,5 µL de Master Mix (*SuperScript*® *III Platinum*® *One-Step Quantitative RT-PCR System with ROX*), 0,5 µL de cada um dos iniciadores a 40 µM, 0,5 µL de probe a 10 µM e 6 µL de água grau pura para biologia molecular e 5 µL do DNA extraído da amostra. As condições de ciclagem



foram modificadas do protocolo original, sendo utilizado o mesmo protocolo para *gltA*-*TaqMan*®.

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos iniciadores (*primer* e *probe*) utilizados nos protocolos de PCR em tempo real para detecção de *Rickettsia* spp e controle interno endógeno, em amostras biológicas de pacientes com suspeita clínica/epidemiológica de Febre Maculosa Brasileira, analisados no Laboratório de Riquetsias do IAL entre 2005 e 2012.

Aplicação	Nome	Gene alvo	Seqüência de nucleotídeo (5'-3')	Tamanho do produto amplificado (bp)
qPCR para <i>Rickettsia</i> spp	CS-5	Citrato Sintase ( <i>gltA</i> )	GAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGAT	147
	CS-6		AGGGTCTTCGTGCATTTCTT	
	CS-Probe		6-FAM d(CATTGTGCCATCCAGCCTACGGT) BHQ-1	
qPCR para <i>Rickettsia</i> spp GFM	RR190. 547F	190-kDa ( <i>ompA</i> )	CCTGCCGATAATTATACAGGTTTA	154
	RR190. 701R		GTCCGTTAATGGCAGCATCT	
Controle Interno endógeno	RnaseP F	<i>RNaseP humana</i>	AGATTTGGACCTGCGAGCG	65
	RnaseP R		GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	
	RnaseP Probe		6-FAM d(TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG) BHQ-1	

#### 4.4.3. Validação dos ensaios de PCR em tempo real

Para validação analítica dos ensaios de PCR em tempo real foi utilizado como padrão positivo uma solução de DNA extraída de co-cultivo de *Rickettsia rickettsii* em células Vero 100% infectadas. A cepa de *Rickettsia rickettsii* utilizada foi isolada no LRIAL, a partir de amostra clínica de paciente com FMB do Estado de São Paulo, a qual foi repicada em cultura de células Vero, identificada por Imunofluorescência indireta e, após extração de DNA foram submetidas a sequenciamento gênico das regiões *ompA*, *ompB* e *gltA* de acordo com REGNERY, *et al.* (1991), sendo

caracterizada como 100% idêntica a cepa *R. rickettsii* Taiacu, previamente isolada de carrapatos *Amblyomma aureolatum*, no Brasil (OGRZEWALSKA, et al., 2011).

Para avaliar a eficiência dos protocolos de PCR em tempo real uma curva de diluição em série de 10 (5 logs) foi processada para detecção de *gltA-TaqMan*® no equipamento ABI500 e para *ompA-SYBR* no LightCycler 480 da Roche. A curva foi realizada em quadruplicata e compostas por 8 pontos de concentração, partindo da amostra pura (sem diluição) até 1:10<sup>-7</sup>.

A maior diluição que produziu sinal de amplificação nos 2 protocolos foi 1:10<sup>-5</sup>. Para cálculo dos parâmetros de eficiência, a concentração inicial do *template* (número de cópias do fragmento alvo) foi considerada hipoteticamente igual a 10<sup>7</sup> por mL (valor estimado considerando-se a existência de aproximadamente 1 cópia na diluição 1:10<sup>-5</sup>, correspondendo ao ponto de maior diluição da curva que produziu sinal de amplificação).

Para os cálculos de eficiência foram excluídos os pontos cuja diluição não produziu sinal de amplificação. Ainda no mesmo ensaio, as concentrações hipotéticas de 10<sup>5</sup> (1:10<sup>-3</sup>) e 10<sup>4</sup> (1:10<sup>-4</sup>) foram replicadas 20x para o cálculo da precisão intra-ensaio.

Para avaliação da especificidade e sensibilidade diagnóstica da PCR em tempo real para detecção de *Rickettsia* spp, foram selecionados do grupo de óbitos “verdadeiros” positivos e negativos fundamentando-se em resultados de outros ensaios de detecção etiológica realizados no IAL como: isolamento microbiológico, imunohistoquímica em tecido parafinado e PCR. As informações foram obtidas do sistema de gestão laboratorial SIGH-IAL.

O grupo de “verdadeiros” positivos foi composto por 36 casos integrantes do grupo de óbitos com diagnóstico de FMB confirmado pela técnica de isolamento bacteriano em cultura celular (n=10 casos) ou por imunohistoquímica em tecido parafinado (n= 26 casos).

O grupo de “verdadeiros” negativos foi composto por 39 integrantes do grupo de óbitos, cujo desfecho da doença foi provocado por agentes etiológicos que fazem parte do diagnóstico diferencial para FMB:

dengue(n=7), febre amarela(n=1), hantavírus(n=1), leptospirose(n=2), meningite (n total=24 *Neisseria meningitidis*, 19 sorogrupo C e 5 sorogrupo B) e Influenza (total=4, 2 H1N1 pandêmico, 1 Influenza B e 1 Influenza A H3N2) confirmados pelas técnicas imunohistoquímica em tecido parafinado, isolamento do agente infeccioso ou PCR.

Para avaliação da especificidade e sensibilidade técnica da PCR em tempo real para o diagnóstico da FMB em relação à outras técnicas moleculares, foram analisadas 50 amostras de soro de casos integrantes do grupo de óbitos, os quais foram previamente analisados no estudo de NASCIMENTO, *et al.* (2009) pelas técnicas de *nested*PCR, seguido de sequenciamento genético. No estudo de NASCIMENTO, *et al.* (2009) ácidos nucleicos extraídos de amostras de soro de 50 casos fatais com suspeita clínica de FMB foram submetidos à *nested*PCR da região gênica *htrA* que codifica a proteína 17KDa, presente em riquetsias do Grupo Febre Maculosa. O fragmento específico *htrA* foi identificado em 20 das 50 amostras analisadas e o sequenciamento gênico dos casos positivos apresentou 100% de identidade com *R rickettsia* e com Grupo Febre Maculosa.

#### **4.4.4. Pesquisa de anticorpos para FMB em amostras de soro**

A RIFI utilizada para detecção dos títulos de anticorpos anti- IgG e anti-IgM nos soros humanos seguiu a metodologia utilizada na rotina do LRIAL. Foram utilizadas lâminas para imunofluorescência impregnadas com antígenos produzidos *in house* a partir de um isolado de *Rickettsia rickettsii* cultivado em células VERO, caracterizado previamente por sequenciamento gênico (OGRZEWALSKA, *et al.*, 2011).

Para produção das lâminas no LRIAL, uma cepa de *Rickettsia rickettsii* mantida em co-cultivo em células Vero foi descongelada e agitada no vortex por 15 seg e 100µL foi inoculado em um tubo de vidro com fundo chato contendo monocamada de células Vero de 24 horas. Foram utilizados 10 tubos, sendo 9 inoculados e 1 controle de células. Após 5 dias de incubação em meio MEM com 5% de SFB e 10µg/mL de glutamina um tubo

inoculado e um controle foram submetidos a RIFI para identificação do crescimento das riquetsias GFM. A cultura foi repicada até alcançar 100% de células Vero infectadas. O meio de cultura foi descartado, o tapete celular contendo células Vero 100% infectadas foi lavado com solução salina estéril 0,85%, em seguida foi adicionado 100 $\mu$ L de ATV e incubado por 10 min a 37°C. Os tubos foram agitados vigorosamente manualmente e o conteúdo transferido para tubos tipo *ependorf* de 2mL estéreis contendo 20 $\mu$ L de SBF. Os tubos foram centrifugados a 12.000xg por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em 1mL de solução salina estéril 0,85%. Os tubos foram novamente centrifugados a 12.000xg por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em salina. O volume final da suspensão foi 10 vezes menor que o volume inicial do meio de cultura, ou seja 100 $\mu$ L/ para cada tubo de cultura. Nas lâminas próprias para RIFI foi adicionado 2 $\mu$ L da suspensão do co-cultivo de *Rickettsia rickettsii* em Vero em cada orifício da lâmina. Após estarem secas, as lâminas foram fixadas em acetona pura por 15 min a 8-10°C e secas no fluxo laminar. Uma lâmina foi utilizada para testar a qualidade da produção utilizando soros com títulos de IgG, IgM e negativos previamente conhecidos. Após a comprovação da qualidade das lâminas as mesmas foram armazenadas no freezer -20°C até o uso. Todo o processo de produção de lâminas de RIFI para riquetsias GFM foi realizado na cabine de segurança biológica nível II e com EPIs apropriados para o procedimento.

Para RIFI, uma alíquota da 1ª e 2ª amostra de soro foi diluída em PBS seguindo-se uma diluição seriada 1:2 a partir de 1:64 e, em seguida colocada sobre a lâmina contendo os antígenos de riquetsias GFM. Após incubação em câmara úmida a 37°C por 30 minutos a lâmina foi lavada com PBS. A cada lâmina foi adicionado o conjugado específico, imunoglobulina anti IgG ou anti IgM humana marcada com fluoresceína diluída 1:100 em corante Azul de Evans (0,01%). Após nova incubação em câmara úmida (37°C, 30 minutos) e lavagem com PBS e água destilada, as lâminas foram

cobertas com lamínula com glicerina tamponada (com 10% de PBS) na interface.

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: bactérias intra e extracelulares com formato característico da espécie, fluorescentes de contornos regulares coloração verde-maçã densa e brilhante, e nos casos negativos: ausência de fluorescência. Foram testadas as diluições 1:64, 1:128 e 1:256 dos soros. Os casos positivos foram confirmados pela verificação da soroconversão e/ou elevação de 4 vezes o título da 1ª para a 2ª amostra.

Nos casos cujos pacientes evoluíram para o óbito impossibilitando a coleta da segunda amostra, foi também realizada a pesquisa de IgM sendo considerados reagentes os títulos que apresentaram IgG e/ou IgM  $\geq 128$ .

#### **4.4.5. Isolamento de riquetsias do GFM em cultura de células**

O isolamento de riquetsias do GFM em cultura de células foi realizado utilizando-se a técnica descrita por MELLEES *et al.* (1999), a qual inclui centrifugação do inóculo sobre as células suscetíveis para aumentar a eficiência do isolamento, sistema denominado *shell vial*. Foram utilizados tubos de vidro com fundo chato, de 14 mm de diâmetro com aproximadamente 100 mm de altura, no fundo de cada tubo foi adaptada uma lamínula circular de 12 mm de diâmetro. Sobre a lamínula circular foi cultivada previamente uma monocamada de células Vero de 24 horas, com aproximadamente  $1 \times 10^5$  células, mantida em meio de cultura MEM (GIBCO/BRL).

Durante processamento das amostras, o meio foi descartado e adicionado em cada tubo sobre a monocamada de células Vero 0,1 - 0,3 mL do macerado do coágulo ou fragmento de biópsia de lesão em 1mL de meio BHI. Em seguida, os tubos foram centrifugados (700xg, 60 min, 25°C), e após descartar o excesso de material foi adicionado 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 36°C por 5 dias.

Foram utilizados três tubos para cada amostra clínica. Em cada grupo de amostras clínicas processadas foi utilizado como controle positivo um isolado de riquetsias GFM identificado anteriormente. Um tubo de células Vero sem inóculo representou o controle negativo.

Após o período de incubação, um tubo de células Vero inoculada de cada amostra biológica e os controles positivo e negativo foram fixados em acetona resfriada por 4 a 8 °C por 10 min. Em seguida, sobre as lamínulas circulares internas contendo a cultura inoculada, foi realizada RIFI para identificação de riquetsias GFM, utilizando-se soro humano positivo na diluição 1:64 em PBS e conjugado anti IgG marcado com fluoresceína 1:100 em corante Azul de Evans (0,01%).

Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram na microscopia 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 as negativas, ausência de fluorescência intra e extracelular.

#### **4.4.6. Análise estatística**

Os resultados das análises foram expressos de forma descritiva qualitativa ou quantitativa, em valor absoluto, média, mediana, desvio padrão e porcentagem. Para análise estatística relativa à eficiência dos protocolos de PCR em tempo real, linearidade, inclinação da curva (*Slope*), coeficiente de correlação ( $R^2$ ) e desvio padrão foram utilizados os softwares dos equipamentos ABI7500 v2.0.5 e LigthCycler®480 SW 1.5.

A quantificação da concordância de resultados entre dois testes foi avaliada com índice Kappa (IC 95%), de acordo com FLEISS, (1981) através do *site*: <http://www.lee.dante.br/pesquisa/kappa/>. A interpretação dos valores de kappa seguiu o recomendado por LANDIS e KOCH. (1977).

A análise quantitativa relacionando diferença nos valores de CT entre dois ensaios pareados de PCR em tempo real foi realizada utilizando o teste de Student pareado bicaudal, com número amostral entre parênteses.

O teste t também foi utilizado para avaliar as diferenças entre as médias de dois grupos quando a distribuição dos dados foi normal e o teste não paramétrico de Mann-Whitney quando a distribuição não foi normal .

Os níveis de significância dos testes foram fixados assumindo um erro tipo 1 de 5% ( $\alpha=0,05$ ).

## 5. Resultados

Foram analisadas amostras biológicas de 539 casos com suspeita clínica e/ou epidemiológica de FMB e 25 indivíduos hígidos, selecionados no período de 2005 a 2012 (**Tabela 2**). Os critérios para seleção dos casos foram: volume de amostra suficiente para análise complementar pela técnica molecular, amostras recentes, casos com maior número de amostras pareadas: soro, sangue, coágulo, biópsia de lesão.

**Tabela 2.** Casos suspeitos de FMB e indivíduos hígidos avaliados pela PCR em tempo real para *Rickettsia* spp, no LRIAL no período de 2005 a 2012.

Ano	Óbitos	Soroconversões	Soronegativos	Controles
2005	0	5	0	0
2006	0	0	0	25
2007	1	4	0	0
2008	3	0	0	0
2009	31	6	10	0
2010	123	12	17	0
2011	156	22	18	0
2012	96	35	0	0
TOTAL	410	84	45	25

Informações obtidas da requisição do exame e SIGH-IAL

A distribuição por sexo mostrou prevalência do sexo masculino em todos os grupos. Nos grupos com suspeita clínica e/ou epidemiológica de FMB (óbitos, soroconversões e soronegativos) na distribuição por faixas etárias os casos distribuíram-se com maior frequência entre 10-59 anos (**Tabela 3**).



**Tabela 3.** Casos suspeitos de FMB e indivíduos hígidos avaliados pela PCR em tempo real para *Rickettsia* spp, no LRIAL no período de 2005 a 2012, distribuídos segundo sexo e faixa etária.

Variáveis	Óbitos n(%)	Soroconversões n(%)	Soronegativos n(%)	Controles n(%)
<b>Feminino</b>	133 (32,4)	26 (31,0)	12 (26,7)	0 (0)
<b>Masculino</b>	277 (67,6)	58 (69,0)	33 (73,3)	25 (100)
<b>Média das idades ± DP (intervalo)</b>	35,0±8,8 (0,3-84)	34,9±17,8 (1-77)	26±18,4 (1-70)	19,9±1,9 (18-25)
<b>0 a 9</b>	37 (9,0)	10 (11,9)	12 (26,7)	0 (0)
<b>10 a 19</b>	70 (17,1)	8 (9,5)	5 (11,1)	14 (56,0)
<b>20 a 29</b>	57 (13,9)	12 (14,3)	10 (22,2)	11 (44,0)
<b>30 a 39</b>	63 (15,4)	18 (21,4)	4 (8,9)	0 (0)
<b>40 a 49</b>	71 (17,3)	12 (14,3)	8 (17,8)	0 (0)
<b>50 a 59</b>	67 (16,3)	16 (19,0)	3 (6,7)	0 (0)
<b>60 a 69</b>	30 (7,3)	5 (6,0)	1 (2,2)	0 (0)
<b>70 a 79</b>	5 (1,2)	1 (1,2)	1 (2,2)	0 (0)
<b>80 a 89</b>	2 (0,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>não informado</b>	8 (2,0)	2 (2,4)	1 (2,2)	0 (0)
<b>Total</b>	410	84	45	25

Informações adquiridas da requisição do exame e SIGH-IAL. DP= desvio padrão

Com relação à distribuição dos casos suspeitos do FMB selecionados por regiões geográficas correspondentes aos IAL regionais, observou-se predomínio das principais regiões endêmicas para a doença no Estado de São Paulo: Campinas, Grande São Paulo, Rio Claro, Sorocaba e Marília.

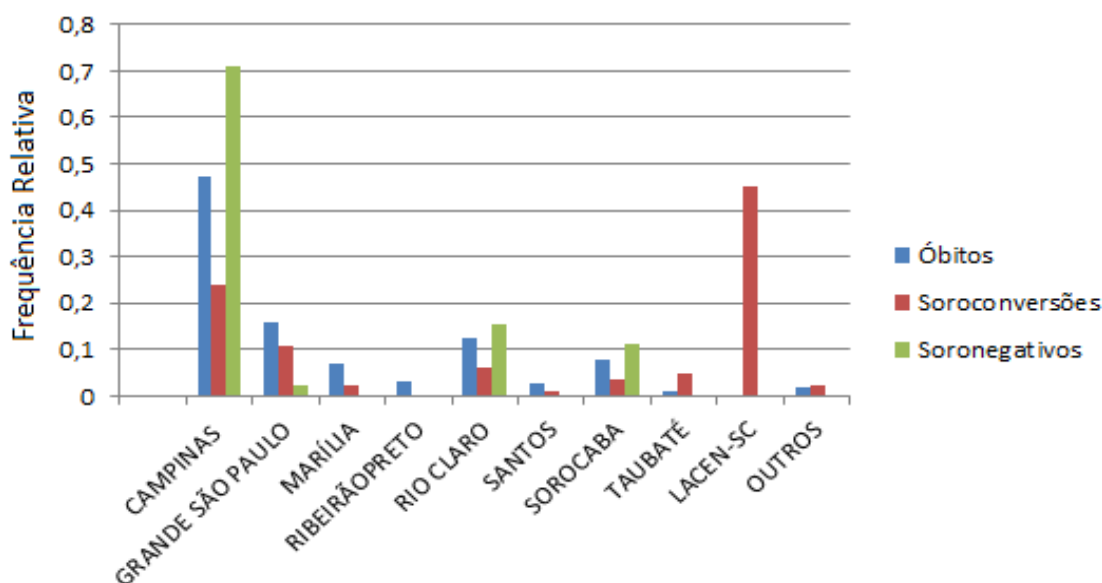
Foram incluídos no grupo das soroconversões casos de procedência do LACEN-SC cuja evolução clínica da doença é benigna, sem ocorrência de casos fatais. Esses casos representaram 50% dos casos no grupo das soroconversões (**Gráfico 2**). Na **Figura 6** estão indicadas as regiões geográficas dos municípios de onde foram procedentes os casos do LACEN-SC incluídos neste estudo.

Os casos foram classificados de acordo com a unidade do IAL regional responsável pelo envio da amostra para o exame. A Grande São Paulo correspondeu à: Cotia (n=1), Diadema (n=13), Francisco Morato (n=2), Franco da Rocha (n=1), Guarulhos (n=2), Itapevi (n=1), Jundiaí (n=1), Mauá

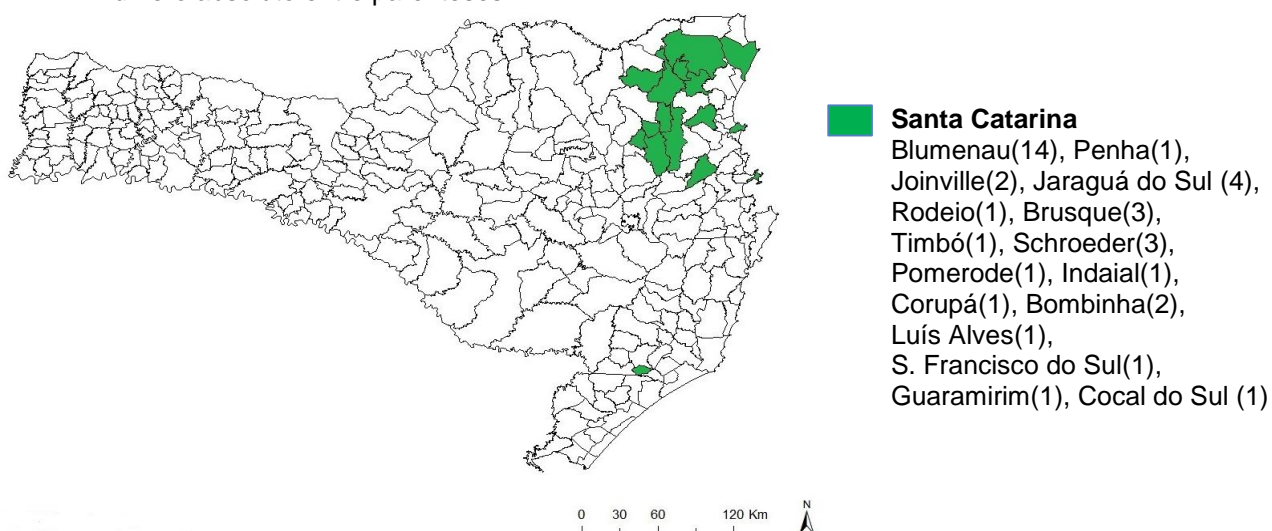
(n=3), São Caetano do Sul (n=2), Santo André (n=10), São Bernardo do Campo (n=12), São José dos Campos (n=2) e São Paulo (n=25) (**Gráfico 2**).

Os controles negativos hígidos foram do município de Campinas.

**Gráfico 2.** Distribuição dos casos suspeitos de FMB segundo as regiões geográficas correspondentes aos IAL regionais, avaliados pela PCR em tempo real para *Rickettsia* spp, no LRIAL entre 2005 e 2012.



Outros correspondem à: Araçatuba (n=1), Presidente Prudente (n=4), LACEN-RS (n=1), São José do Rio Preto (n=3). Fonte: Informações obtidas das requisições dos exames e SIGH-IAL. Número absoluto entre parênteses.



**Figura 6.** Distribuição geográfica dos municípios de Santa Catarina com casos de FMB diagnosticados pela sorologia e PCR em tempo real para *Rickettsia* spp realizados no LRIAL, entre 2005 e 2012. Número absoluto entre parênteses.

Entre os casos com suspeita clínica/epidemiológica de FMB: óbitos, soroconversões e soronegativos, o intervalo entre o aparecimento dos primeiros sintomas (apresentação da doença) e a coleta da primeira amostra biológica para diagnóstico de FMB foi em média de 5 e 6 dias em todos os grupos (**Tabela 4**). Foram excluídos desta análise os casos sem informação sobre esse ítem na requisição do exame.

**Tabela 4.** Emprego da PCR em tempo real no diagnóstico da FMB considerando-se o tempo transcorrido entre o início da doença e coleta de amostra biológica para o diagnóstico realizado no LRIAL no período entre 2005 e 2012.

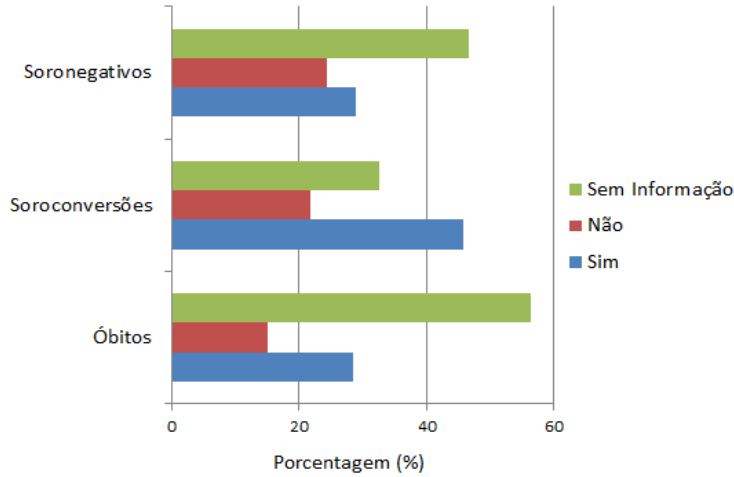
$\Delta T$ (dias)	Óbitos	Soroconversões	Soronegativos
Média	6,2	5,9	5,4
Mediana	5	5,5	5
Desvio Padrão	7,4	3,4	3,6
Intervalo Máximo	84	14	15
Intervalo Mínimo	1	1	1
Com Informação (n)	332	80	45
*Sem Informação (n)	78	4	0

$\Delta T$ = Intervalo, em dias, entre a apresentação da doença e coleta da primeira amostra para diagnóstico laboratorial. \* Sem informação= casos excluídos da análise por falta de informação sobre a idade do paciente. Fonte: Informações obtidas da requisição do exame e SIGH-IAL.

Quanto à informação referente ao uso de antibiótico, esta informação ficou prejudicada uma vez que em muitos casos essa informação não foi registrada.

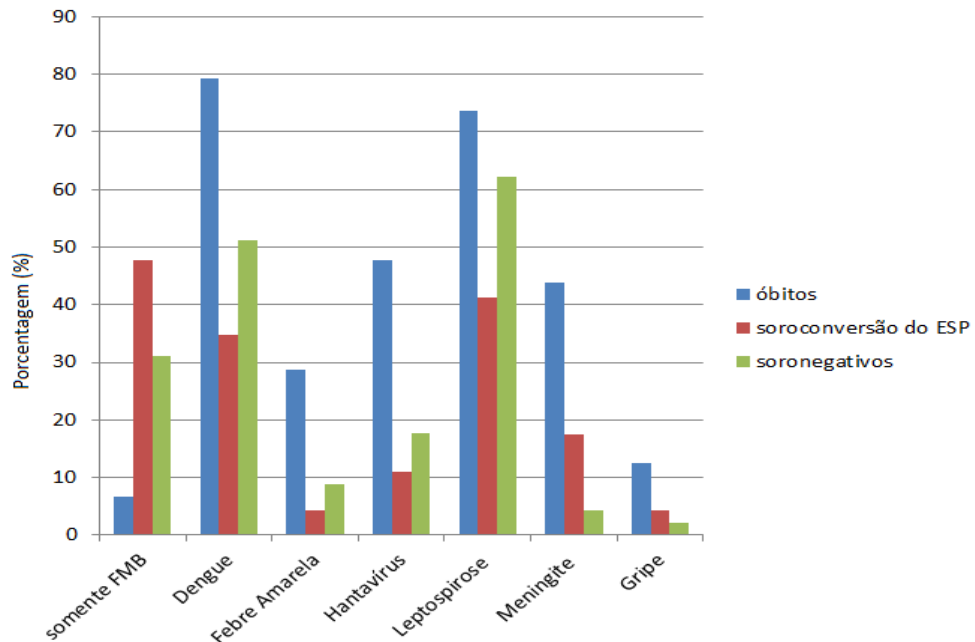
Como os primeiros sintomas da FMB são inespecíficos, a maioria dos casos suspeitos de FMB também possui suspeita para outras doenças, particularmente as que causam febres hemorrágicas. Neste estudo foram levantadas informações sobre suspeita para outras doenças simultaneamente a FMB na população estudada. Utilizando-se o banco de dados do SIGH-IAL, dos exames realizados no IAL, foi observado que, os diagnósticos diferenciais para dengue e leptospirose foram os mais solicitados. (**Gráfico 4**).

**Gráfico 3.** Informação sobre a antibioticoterapia nos casos suspeitos de FMB avaliados pela PCR em tempo real para *Rickettsia* spp, no LRIAL entre 2005 e 2012.



Fonte: Informações obtidas das requisições dos exames e SIGH-IAL. Os casos enviados pelo LACEN-SC foram excluídos desta análise porque as requisições para os exames não constam esse quesito.

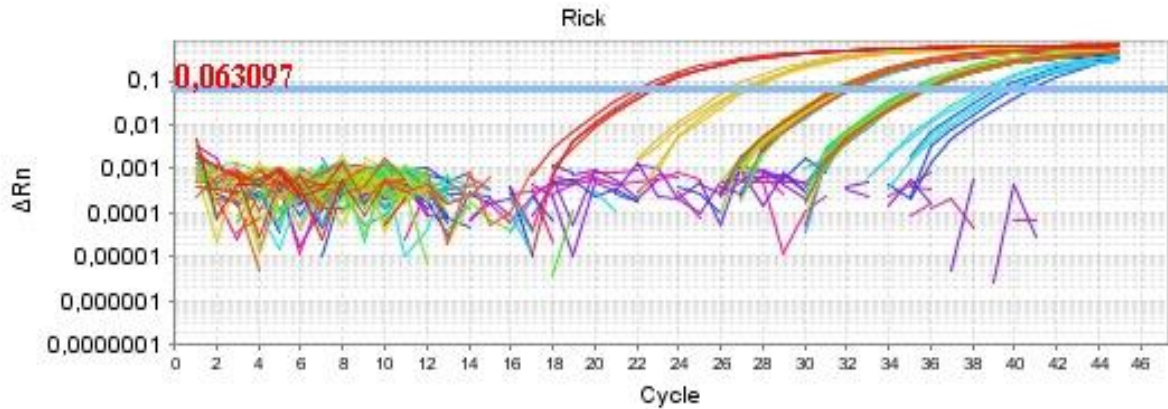
**Gráfico 4.** Diagnósticos diferenciais dos casos suspeitos de FMB avaliados pela PCR em tempo real para *Rickettsia* spp, no LRIAL entre 2005 e 2012.



Fonte: SIGH-IAL Os casos enviados pelo LACEN-SC foram excluídos desta análise porque os diagnósticos diferenciais não são realizados pelo IAL. ESP= Estado de São Paulo

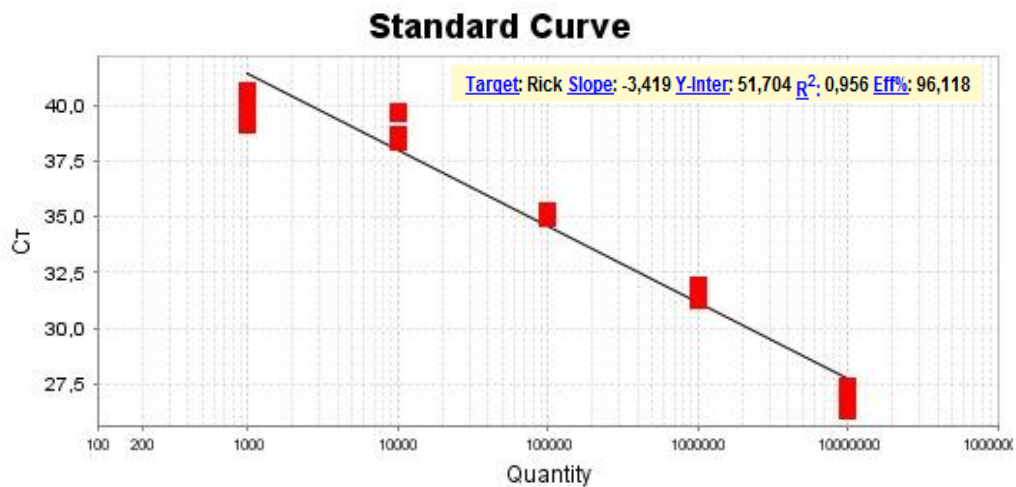
## 5.1. Validação dos ensaios de PCR em tempo real

A seguir estão registrados os resultados obtidos dos testes para avaliação da eficiência dos protocolos de PCR em tempo real para *Rickettsia* spp.



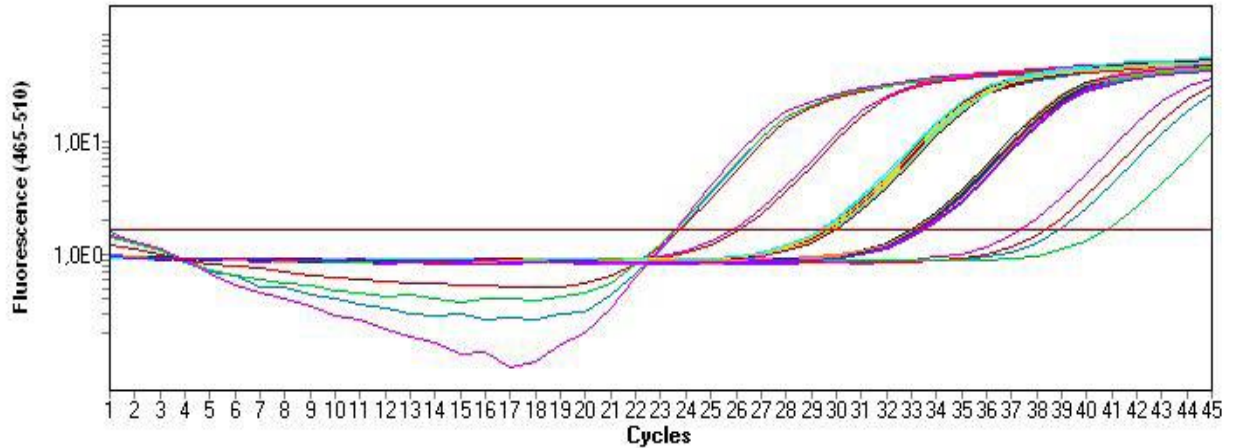
**Figura 7.** Perfil logarítmico da absorvância emitida durante cada ciclo no protocolo da curva de concentração decrescente para o protocolo de PCR em tempo real *gltA-TaqMan*®. Equipamento utilizado: ABI7500. Neste gráfico estão incluídas as 20 replicatas de  $10^5$  e  $10^4$  para a análise da precisão das medidas. Registro de resultado de experimento interpretado pelo software ABI7500 v2.0.5.

**Gráfico 5.** Curva padrão de eficiência para o protocolo de PCR em tempo real *gltA-TaqMan*®, analisado no equipamento ABI7500, utilizando como alvo DNA de *Rickettsia rickettsii* extraída de co-cultivo de células Vero.



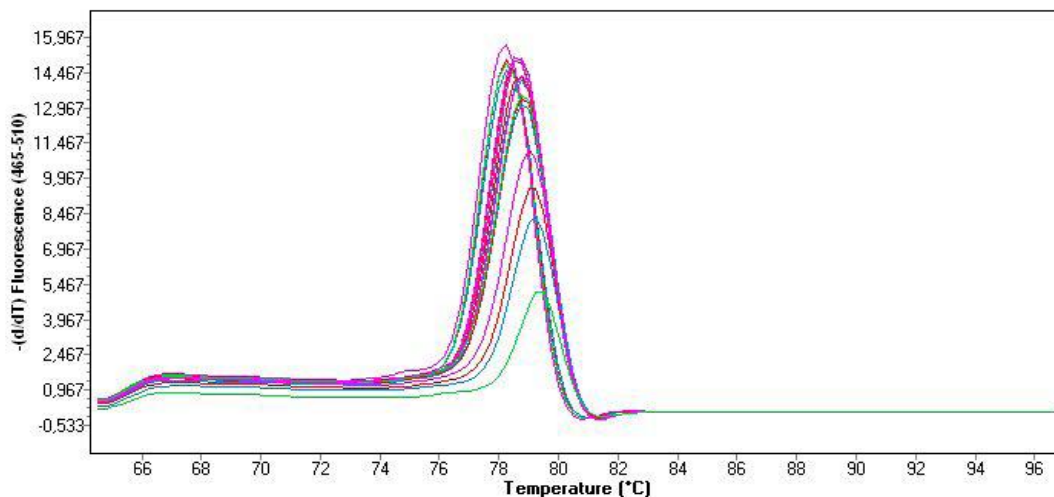
Para o cálculo da eficiência das curvas foram selecionados 5 pontos e, número de replicatas entre 3-4. Fonte: Registro de resultado de experimento interpretado pelo software ABI7500 v2.0.5.

Na **Figura 8** observa-se a curva de concentração decrescente para o protocolo de PCR em tempo real *OmpA*-SYBR utilizando como *template* DNA de *Rickettsia rickettsii* extraído de co-cultivo de células Vero.



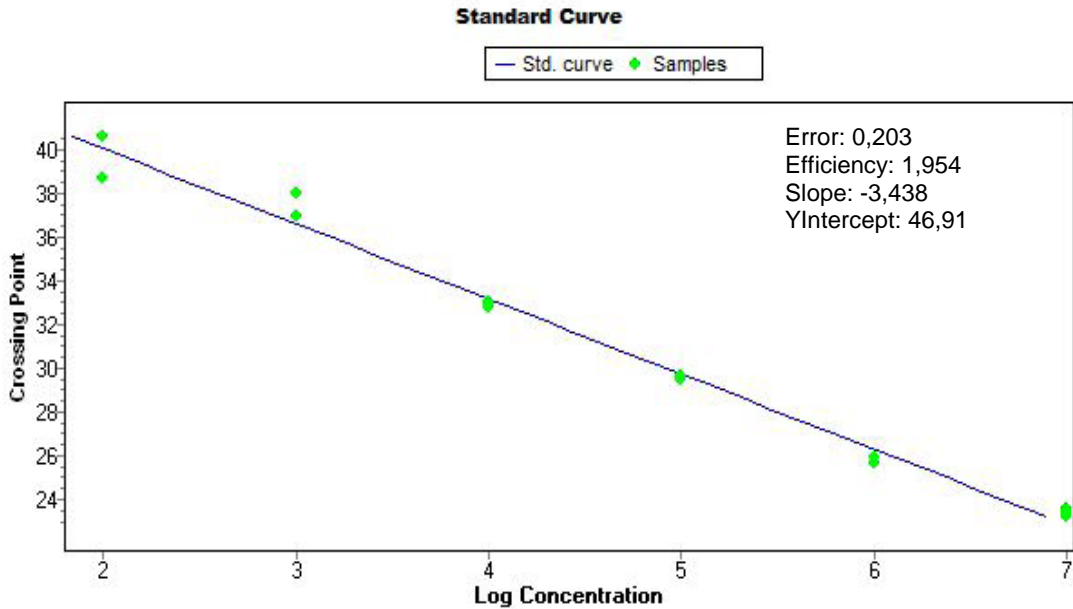
**Figura 8.** Perfil linear da absorvância emitida durante cada ciclo da curva de concentração decrescente para o protocolo de PCR em tempo real *OmpA*-SYBR. Equipamento: Light Cycler II-480- Roche e software: LightCycler®480 SW1.5. Estão incluídas as 20 replicatas de  $10^5$  e  $10^4$  para análise da precisão das medidas.

A temperatura de dissociação dos fragmentos amplificados no protocolo de PCR em tempo real *OmpA*-SYBR variou entre 78,24 a 79,14 °C (**Figura 9**).



**Figura 9.** Padrão de dissociação (*melting*) dos produtos amplificados na curva concentração decrescente para o protocolo de PCR em tempo real *OmpA*-SYBR. Equipamento: Light Cycler II-480- Roche. Registro de resultado de experimento interpretado pelo software: LighCycler®480 SW 1.5.

**Gráfico 6.** Curva padrão de eficiência para o protocolo de PCR em tempo real *OmpA*-SYBR. Foi utilizado DNA de *Rickettsia rickettsii* extraído de co-cultivo em células Vero. Equipamento: Light Cycler II-480- Roche.



Para o cálculo da eficiência da curva foram selecionados 5 pontos e, número de replicatas entre 2-4. Fonte: Registro de resultado de experimento interpretado pelo software: LighCycler @480 SW 1.5.

As informações detalhadas sobre o desempenho das reações estão na **Tabela 5**. Não foi realizada avaliação do desempenho para o protocolo de PCR em tempo real para o controle interno endógeno RNase P pois trata-se de um protocolo já validado pelo CDC e utilizado na rotina do IAL para pesquisa do vírus Influenza (SHU, *et al.*, 2009, CDC REF.# 1-007-05).

**Tabela 5.** Avaliação do desempenho dos protocolos de PCR em tempo real para diagnóstico laboratorial da FMB, realizados no LRIAL entre 2005 e 2012.

Concentração estimada (diluição)	CT médio ± Desvio Padrão	
	<i>ompA</i> -SYBR LigthCycler 480	<i>gltA</i> -TaqMan® ABI7500
10 <sup>+7</sup> (puro)	22,2 ± 0,1	22,5 ± 0,4
10 <sup>+6</sup> (1:10)	24,1 ± 0,5	26,9 ± 0,5
10 <sup>+5</sup> (1:10 <sup>-2</sup> )	27,6 ± 0,1	31,6 ± 0,3
10 <sup>+4</sup> (1:10 <sup>-3</sup> )	31,5 ± 0,1	35,1 ± 0,2
10 <sup>+3</sup> (1:10 <sup>-4</sup> )	36,0 ± 0,8	39,1 ± 0,7
10 <sup>+2</sup> (1:10 <sup>-5</sup> )	37,6 ± 1,3	39,9 ± 0,8
<b>Threshold</b>	0,707	0,063
<b>Curva de <i>melting</i> (Temperatura de dissociação, °C)</b>	78, 2 a 79,1	-
<b>Inclinação da curva (<i>slope</i>)</b>	-3,438	-3,419
<b>Eficiência (%)</b>	97,7	96,18
<b>R<sup>2</sup></b>	0,972	0,956
<b>Intercepto com eixo Y</b>	46,9	51,7
10 <sup>+5</sup> (20 replicatas)	27,58 ± 0,06	30,90 ± 0,18
10 <sup>+4</sup> (20 replicatas)	31,49 ± 0,08	34,56 ± 0,16

Concentração estimada = número de cópias/mL , diluição= diluição do DNA de *Rickettsia rickettsii* extraído de co-cultivo em células Vero 100% infectadas. *Threshold*=limiar definido pelo software do equipamento considerando o sinal basal de fluorescência e a fase exponencial das curvas amplificadas. CT= número do ciclo onde o sinal de amplificação cruzou o *threshold*.

O coeficiente de correlação entre o sinal produzido pelo aparelho e a concentração do *template* (R<sup>2</sup>), e a inclinação da curva (*slope*) corresponderam à eficiência de reação maior que 95% para os dois protocolos para detecção de *Rickettsia* spp (Tabela 5).

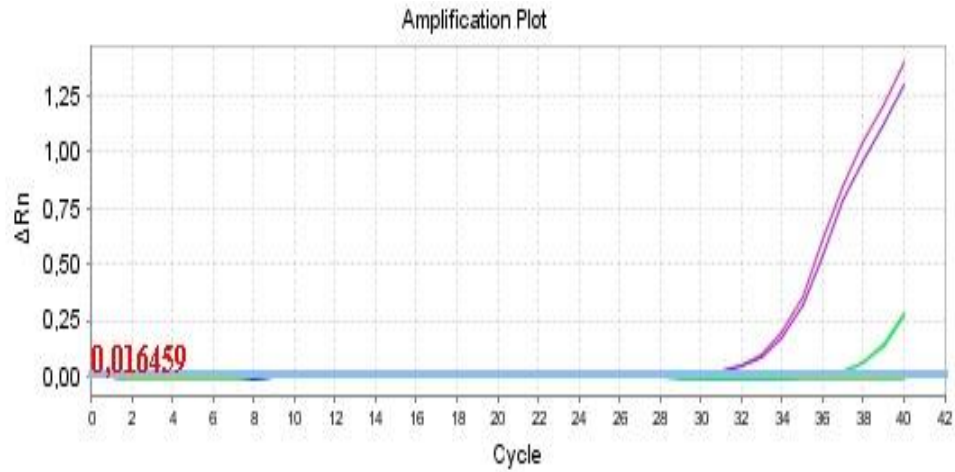


No ensaio de precisão, a medida pelo desvio padrão das 20 replicatas (raiz quadrática da variância), nos dois níveis de concentração,  $10^{+5}$  e  $10^{+4}$ , foi menor do que 0,250 para os dois protocolos de PCR em tempo real para *Rickettsia* spp, sendo compatível com intervalo de confiança de 95% (**Tabela 5**).

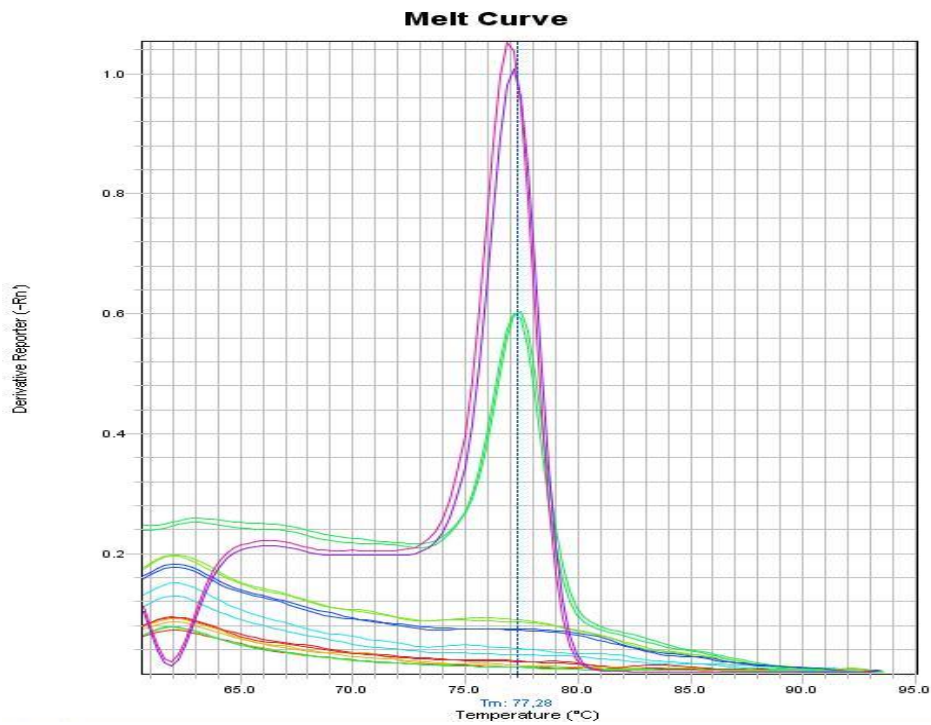
Com relação à robustez dos protocolos de PCR em tempo real, pequenas variações (+20% a -20%) no volume da amostra clínica para extração, e concentrações de *primers*, *probes*, enzima polimerase, *master mix* e água não produziram variações significativas na leitura qualitativa dos resultados.

Os protocolos *gltA-TaqMan®* e *ompA-SYBR* foram avaliados em dois equipamentos disponíveis no Centro de Virologia do IAL (ABI7500 e LC480-ROCHE) e também não houve diferenças na leitura qualitativa dos resultados (**Figura 10 a 12**). Porém, como o tempo total do protocolo *ompA-SYBR* foi 20% maior no equipamento ABI 7500, para esse protocolo foi preferencialmente utilizado o LC480-Roche.

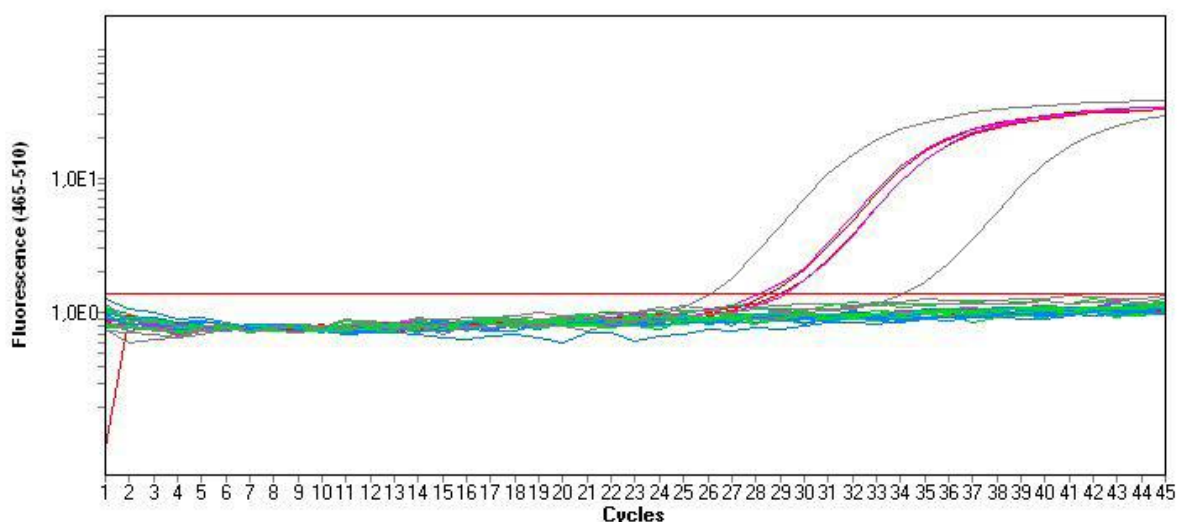
O reagente *TaqMan PCR Master mix* (cod.4304437, Lote P07274, Applied Biosystems, comercializado pela Life Technologies do Brasil) indicado para protocolos que utilizam probe tipo *TaqMan®* e *template* de DNA foi avaliado em substituição ao *Master mix SuperScript® III Platinum® One-step qRT-PCR System (Invitrogen®)* indicado para pesquisa de *template* de RNA, houve diminuição significativa da sensibilidade do protocolo *gltA-TaqMan®*, com alteração do resultado qualitativo.



**Figura 10.** Sinal da absorvância emitida durante cada ciclo no protocolo de PCR em tempo real *OmpA*-SYBR utilizado para o diagnóstico laboratorial da FMB, analisado pelo equipamento ABI 7500.



**Figura 11.** Curvas de dissociação dos fragmentos amplificados no protocolo de PCR em tempo real *OmpA*-SYBR utilizado no diagnóstico laboratorial da FMB, analisado pelo software do equipamento ABI 7500.



**Figura 12.** Absorvância emitida durante cada ciclo no protocolo de PCR em tempo real *gltA-TaqMan®* utilizado para o diagnóstico laboratorial da FMB, analisado no equipamento: Light Cycler II-480- Roche.

## 5.2. Aplicação dos protocolos de PCR em tempo real nos grupos de estudo

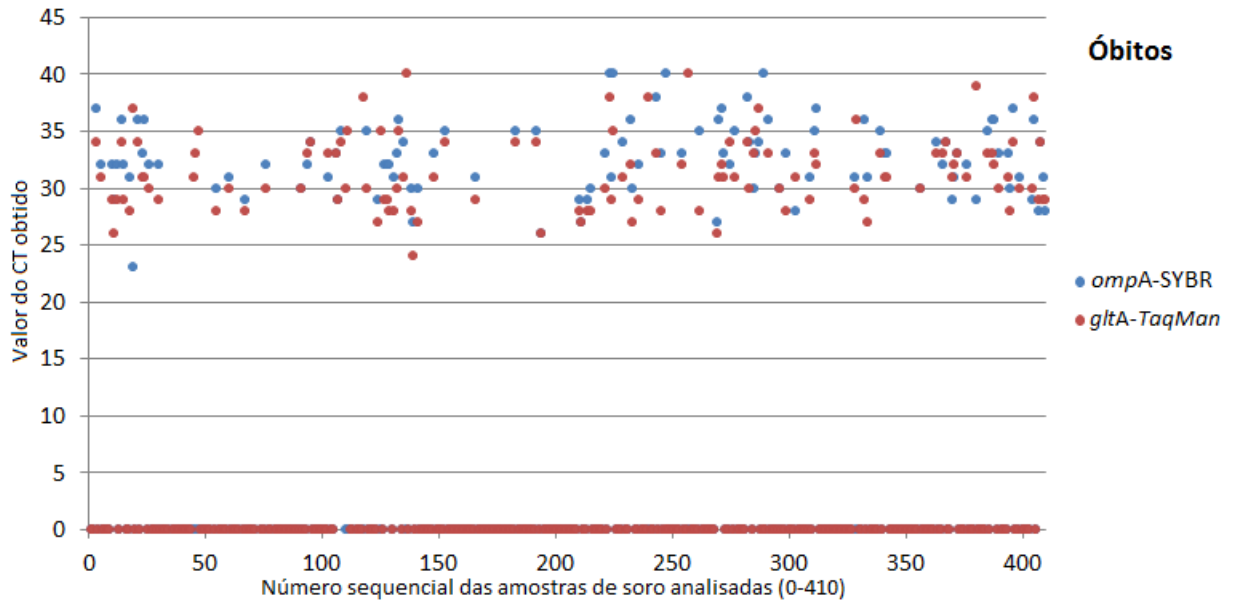
A **Tabela 6** apresenta a frequência de positividade encontrada nos grupos estudados nos protocolos de PCR em tempo real para FMB, em amostras de soro, e os valores médios de CT obtidos.

**Tabela 6.** Resultados dos protocolos de PCR em tempo real para o diagnóstico laboratorial da FMB e RNaseP humana nos grupos analisados no LRIAL entre 2005 a 2012.

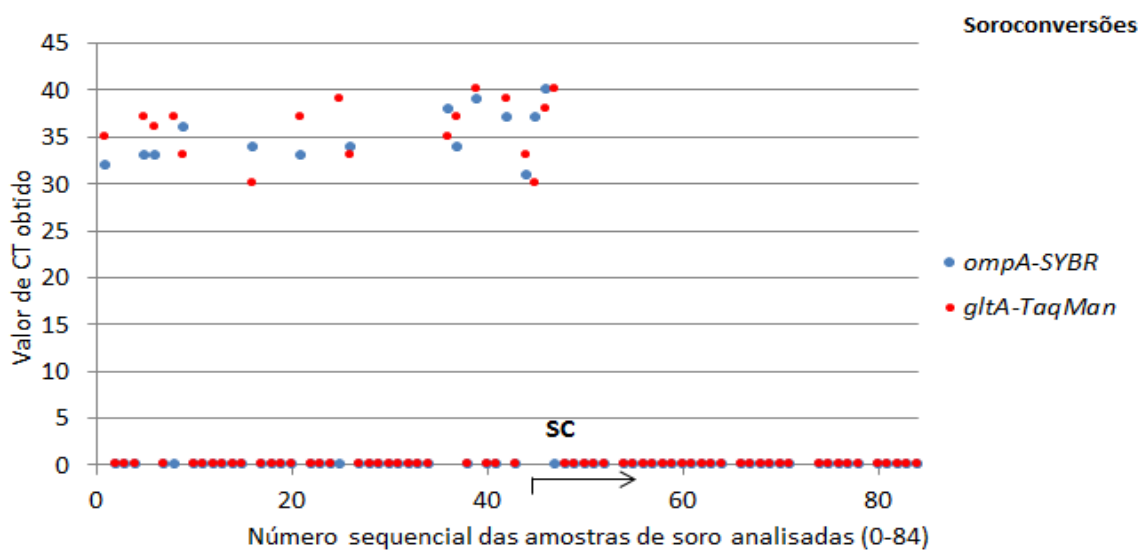
Grupos	<i>ompA</i> -SYBR		<i>gltA-TaqMan®</i>		RNaseP	
	Positivos (%)	CT médio ± DP	Positivos (%)	CT médio ± DP	Positivos (%)	CT médio ± DP
Óbitos (n=410)	112 (27,3)	32,6 ± 3,1	121 (29,5)	31,4 ± 3,2	398 (97,1)	26,1 ± 3,3
Soroconversões (n=84)	15 (17,9)	35,7 ± 2,7	18 (21,4)	35,7 ± 3,1	84 (100,0)	29,1 ± 2,7
Soronegativos (n=45)	0 (0)	0 (0)	2 (4,4)	38,5 ± 2,1	45 (100,0)	30,1 ± 2,5
Controles (n=25)	0 (0)	0 (0)	1 (4,0)	40	25 (100,0)	30,7 ± 1,2

CT=número do ciclo em que a curva de amplificação cruzou o limiar de referência chamado *Threshold*.

**Gráfico 7.** Valores de CT obtidos nos protocolos de PCR em tempo real *gltA-TaqMan*® e *ompA-SYBR* utilizados para o diagnóstico laboratorial da FMB no grupo dos óbitos, em amostra de soro, analisadas no LRIAL entre 2005 e 2012.

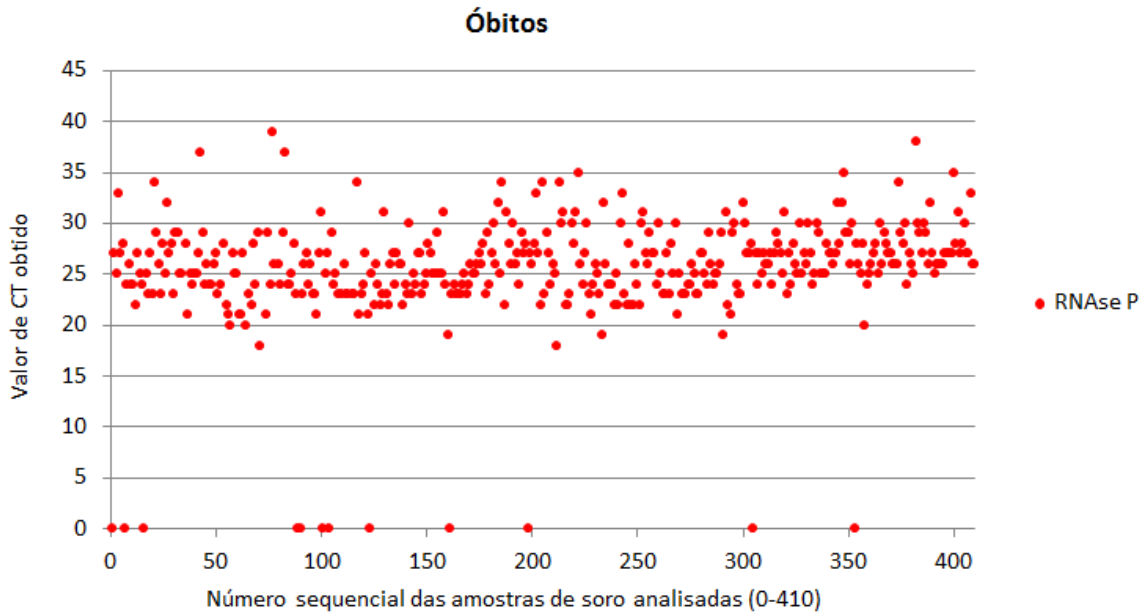


**Gráfico 8.** Valores de CT obtidos nos protocolos de PCR em tempo real *gltA-TaqMan*® e *ompA-SYBR* utilizados para o diagnóstico laboratorial da FMB no grupo de soroconversões, em amostra de soro, analisadas no LRIAL entre 2005 e 2012.

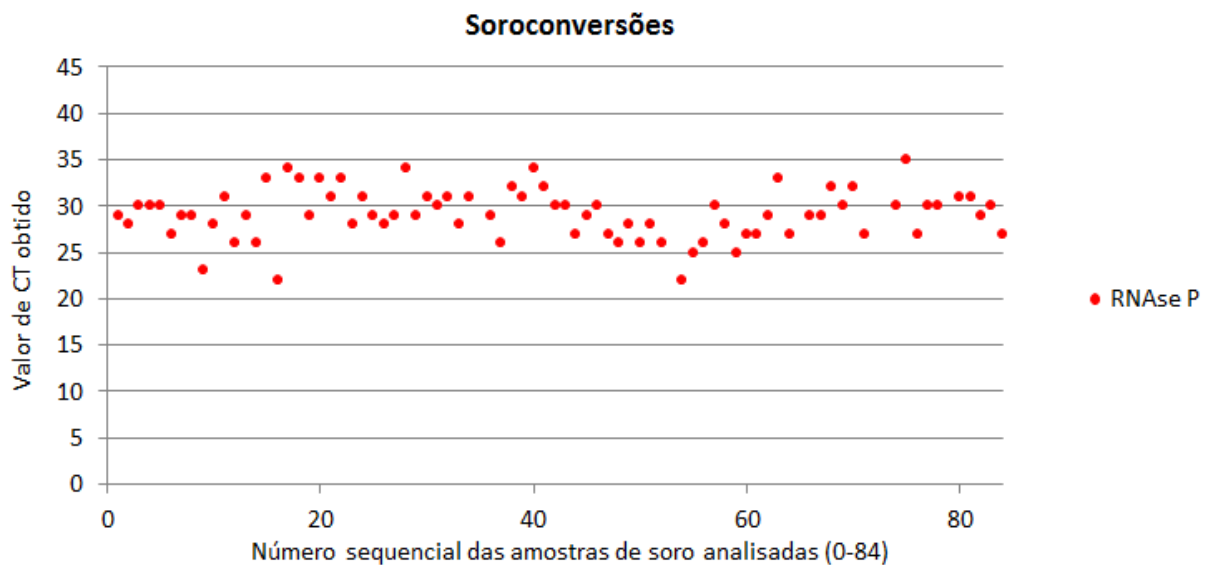


SC= casos do Estado de Santa Catarina, de 47 a 84.

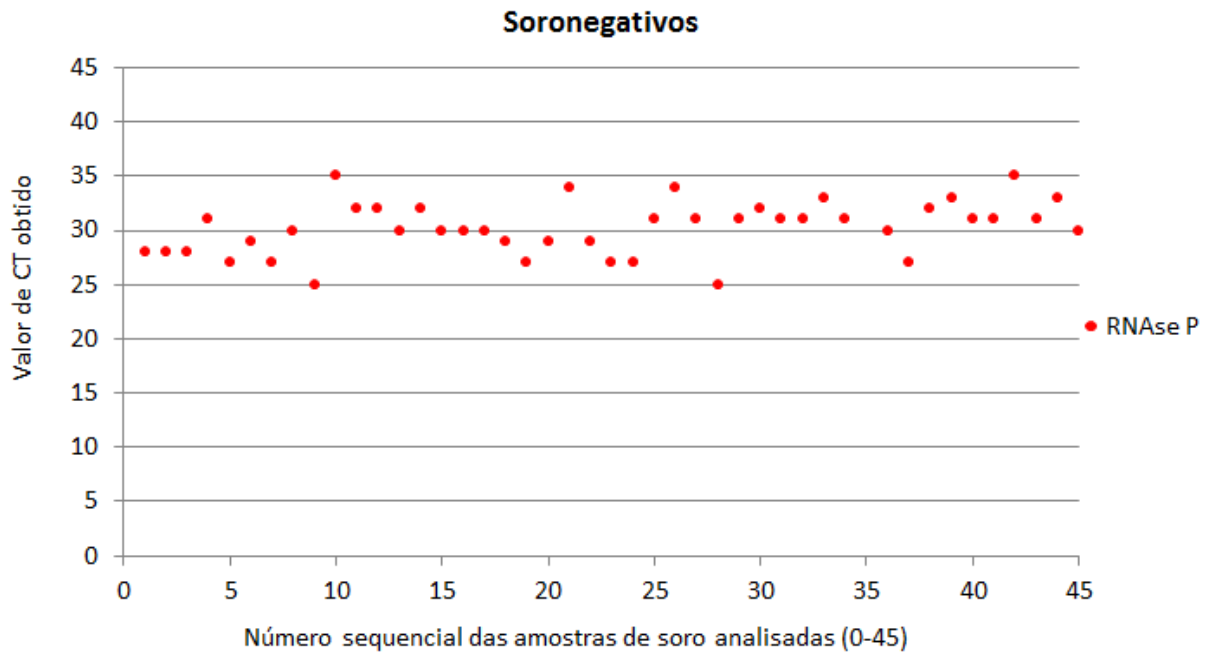
**Gráfico 9.** Valores de CT obtidos no protocolo de PCR em tempo real para o controle interno endógeno (RNaseP humana) no grupo de óbitos, em amostra de soro, analisadas no LRIAL entre 2005 e 2012.



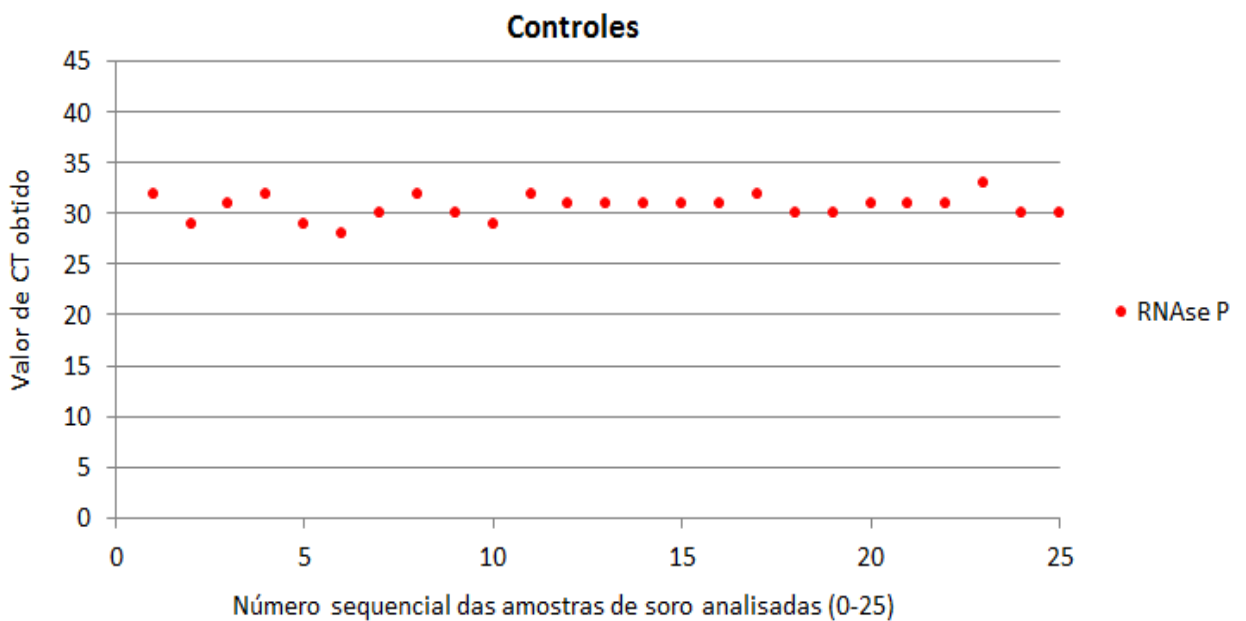
**Gráfico 10.** Valores de CT obtidos no protocolo de PCR em tempo real para o controle interno endógeno (RNaseP humana) no grupo de soroconversões, em amostra de soro, analisadas no LRIAL entre 2005 e 2012.



**Gráfico 11.** Valores de CT obtidos no protocolo de PCR em tempo real para o controle interno endógeno (RNaseP humana) no grupo de soronegativos, em amostra de soro, analisadas no LRIAL entre 2005 e 2012.



**Gráfico 12.** Valores de CT obtidos no protocolo de PCR em tempo real para o controle interno endógeno (RNaseP humana) no grupo de controles hígidos, em amostra de soro, analisadas no LRIAL entre 2005 e 2012.



No grupo de óbitos, em 12 casos (2,93%) não houve amplificação da RNase P em amostras de soro, ou seja, o controle interno endógeno falhou indicando que a qualidade da amostra ou do seu processamento não foi suficiente para validar os resultados da PCR em tempo real. Destes, 5 casos corresponderam à amostras colhidas após o óbito.

### 5.3. Correlação entre os protocolos de PCR em tempo real para *Rickettsia* spp nas amostras analisadas

Nas amostras enviadas para sorologia para FMB, a análise de correlação entre os resultados obtidos com os protocolos de PCR em tempo real *gltA-TaqMan®* e *ompA-SYBR*, no grupo de óbitos, resultou em Kappa=0,922,  $p < 0,001$  e intervalo de confiança 95% entre 1,0 e 0,825 (LANDIS e KOCH., 1977) (**Tabela 7**).

**Tabela 7.** Comparação entre os resultados obtidos com os protocolos de PCR em tempo real *gltA-TaqMan®* e *ompA-SYBR* utilizados para o diagnóstico laboratorial da FMB, no grupo de óbitos, em amostras enviadas para sorologia para FMB analisadas no LRIAL entre 2005 e 2012.

Protocolos de qPCR avaliados	<i>ompA-SYBR</i>		
	(+)	(-)	Total
(+)	110	11	121
<i>gltA-TaqMan®</i> (-)	2	287	289
Total	112	298	410

No grupo de soroconversões, a análise de correlação entre os resultados obtidos com o protocolo de PCR em tempo real *gltA-TaqMan®* e *ompA-SYBR*, em amostras de soro, resultou em Kappa=0,887,  $p < 0,001$  e intervalo de confiança 95% entre 1,0 e 0,675 (**Tabela 8**).

**Tabela 8.** Comparação entre os resultados obtidos com os protocolos de PCR em tempo real *gltA-TaqMan®* e *ompA-SYBR* utilizados para o diagnóstico laboratorial da FMB, no grupo de soroconversões, em amostras de soro analisadas no LRIAL entre 2005 e 2012.

Protocolos de qPCR avaliados	<b><i>ompA-SYBR</i></b>		
	(+)	(-)	Total
(+)	15	3	18
<b><i>gltA-TaqMan®</i></b> (-)	0	66	66
Total	15	69	84

No grupo de soroconversões 21 amostras de soro colhidas na fase de convalescença foram processadas, sendo negativas tanto no protocolo de PCR em tempo real *gltA-TaqMan®* como no protocolo *ompA-SYBR*. O controle interno endógeno (RNase P) foi amplificado em todas amostras.

No grupo de soronegativos, não houve positivos no protocolo *ompA-SYBR*, porém em 2 casos, na análise do soro foi detectada curva de amplificação no protocolo *gltA-TaqMan®* com CTs altos (37 e 40). Em todos os casos soronegativos o controle interno endógeno (RNaseP) foi amplificado.

No grupo de controles hígidos, não houve soros positivo no protocolo para *gltA-TaqMan®*, mas em um caso foi detectado curva de amplificação no protocolo *ompA-SYBR* (CT=40). O controle interno endógeno (RNase P) foi amplificado em todas amostras.

#### **5.4. Correlação entre a positividade e o tipo de amostra**

No grupo dos óbitos, 37 casos foram identificados como tendo sido enviado sangue *post-mortem* para sorologia para FMB. Esses casos foram



utilizados para avaliar a eficiência dos protocolos de PCR em tempo real *gltA-TaqMan®* e *ompA-SYBR* neste tipo de material. A correlação entre os resultados dos protocolos de PCR em tempo real mostrou kappa= 0,881,  $p < 0,001$  e intervalo de confiança 95% entre 1,0 e 0,559 (**Tabela 9**).

**Tabela 9.** Comparação dos resultados qualitativos obtidos com os protocolos de PCR em tempo real *gltA-TaqMan®* e *ompA-SYBR* utilizados para o diagnóstico laboratorial da FMB, no grupo de óbitos, em amostras de sangue *post-mortem*, analisadas no LRIAL entre 2005 e 2012.

Protocolos de qPCR para <i>Rickettsia</i> spp avaliados	<i>ompA-SYBR</i>		
	(+)	(-)	Total
(+)	12	1	13
<b><i>gltA-TaqMan®</i></b> (-)	1	23	24
Total	13	24	37

A análise dos valores de CT obtidos em amostra de soro *versus* sangue mostrou valores de CT em amostras de sangue maiores que os obtidos em amostras de soro. Para o protocolo de PCR em tempo real *ompA-SYBR*  $36,80 \pm 4,08$  e  $31,90 \pm 3,21$  respectivamente ( $p=0,001$ ) e para *gltA-TaqMan®*  $32,36 \pm 5,50$  e  $29,50 \pm 2,88$  respectivamente ( $p=0,003$ ). Foi realizado teste t pareado, bicaudal,  $n=12$ .

A análise de concordância de resultados, entre sangue e soro resultou em um kappa menor para o protocolo *ompA-SYBR* (kappa=0,745  $p < 0,001$ , intervalo de confiança 95% entre 1,0 e 0,433) em relação ao *gltA-TaqMan®*, (kappa=0,877,  $p < 0,001$ , intervalo de confiança 95% entre 1,0 e 0,557) (**Tabela 10**).

**Tabela 10.** Comparação entre os protocolos de PCR em tempo real *ompA*-SYBR (A) e *gltA-TaqMan*® (B) utilizados para o diagnóstico laboratorial da FMB, em amostra de sangue *post-mortem* versus soro, no grupo de óbitos analisados no LRIAL entre 2005 e 2012.

**A) *ompA*-SYBR**

Tipo de amostra biológica	Soro		
	(+)	(-)	Total
(+)	9	0	9
<i>Sangue</i> (-)	4	24	28
Total	13	24	37

**B) *gltA-TaqMan*®**

Tipo de amostra biológica	Soro		
	(+)	(-)	Total
(+)	11	0	11
<i>Sangue</i> (-)	2	24	26
Total	13	24	37

Com relação aos coágulos sanguíneos no grupo de pacientes que evoluíram para o óbito (n=61), na comparação entre os protocolos de PCR em tempo real a concordância entre os protocolos *gltA-TaqMan*® e *ompA*-SYBR resultou em kappa= 0,295, p=0,001 e intervalo de confiança 95% entre 0,474 e 0,115 (**Tabela 11**). Um caso foi excluído, pois resultou em RNase P Negativo.

**Tabela 11.** Comparação entre os protocolos de PCR em tempo real *gltA-TaqMan*® e *ompA*-SYBR utilizados para o diagnóstico laboratorial da FMB, no grupo de óbitos, em amostras de coágulo sanguíneo analisadas no LRIAL entre 2005 e 2012.

Protocolos de qPCR avaliados	<b><i>ompA</i>-SYBR</b>		
	(+)	(-)	Total
(+)	7	19	26
<b><i>gltA-TaqMan</i>®</b> (-)	0	35	35
Total	7	54	61

Na análise de concordância de resultados entre as amostras biológicas de soro e coágulo foram considerados como positivos no soro apenas aqueles que tiveram concordância de resultado nos dois protocolos *gltA-TaqMan*® e *ompA-SYBR*.

No grupo de pacientes que evoluíram para o óbito foram excluídos da análise um caso positivo apenas no protocolo *gltA-TaqMan*® no soro, três casos por apresentarem RNase P negativa no soro e um caso RNase P negativa no coágulo.

Quando o soro foi comparado com o coágulo, para o protocolo *ompA-SYBR*, a análise de 56 casos no grLupo de óbitos resultou em kappa=0,259, p=0,004, com intervalo de confiança 95% entre 0,435 e 0,083 (**Tabela 12**).

A análise de concordância de resultados entre soro e coágulo utilizando o protocolo *gltA-TaqMan*® resultou em kappa=0,928, p<0,001, intervalo de confiança 95% entre 1,0 e 0,666 (**Tabela 12**).

Os valores de CT obtidos em amostra de soro *versus* coágulo mostraram-se maiores nas amostras de coágulo em relação às amostras de soro para o protocolo *ompA-SYBR*, sendo 38,18±2,23 e 33,27±2,41 respectivamente (p=0,001).

Para o protocolo *gltA-TaqMan*® não houve diferença significativa entre os valores de CT tanto para o soro como para o coágulo, sendo 31,45±3,49 e 30,72±2,33 respectivamente (p=0,382). Foi aplicado teste t para avaliar diferenças entre os valores de CT em amostras pareadas para cada um dos protocolos de PCR em tempo real.

**Tabela 12.** Comparação dos protocolos de PCR em tempo real *ompA*-SYBR (A) e *gltA-TaqMan*® (B) utilizados para o diagnóstico laboratorial da FMB, em amostra de soro e coágulo sanguíneo do grupo de pacientes que evoluíram para o óbito, analisados no LRIAL entre 2005 e 2012.

**A) *ompA*-SYBR**

Tipo de amostra biológica	Soro		
	(+)	(-)	Total
(+)	6	0	6
Coágulo (-)	19	31	50
Total	25	31	56

**B) *gltA-TaqMan*®**

Tipo de amostra biológica	Soro		
	(+)	(-)	Total
(+)	24	1	25
Coágulo (-)	1	30	31
Total	25	31	56

No grupo de soroconversões, nove coágulos sanguíneos foram processados, dois deles foram positivos no protocolo *gltA-TaqMan*® e não houve positivos no protocolo *ompA*-SYBR. Todos os coágulos deste grupo amplificaram o controle interno endógeno (RNAseP).

A análise de concordância de resultados no grupo de soroconversões entre os tipos de amostra soro e coágulo resultou em baixa concordância para o protocolo de pCR em tempo real *ompA*-SYBR (não se aplica o kappa), e para *gltA-TaqMan*® com kappa=0,526, p=0,073, intervalo de confiança 95% entre 1,0 e -0,049 (**Tabela 13**)

No grupo de soronegativos, as amostras de coágulos foram negativas no protocolo de PCR em tempo real *ompA*-SYBR e, em um caso houve amplificação no protocolo para *gltA-TaqMan*® com CT de 40, porém com amostra de soro pareada negativa. Todos os coágulos do grupo soronegativos amplificaram o controle interno endógeno (RNAseP).

**Tabela 13.** Comparação entre os protocolos de PCR em tempo real *ompA*-SYBR (A) e *gltA-TaqMan*® (B) utilizados para o diagnóstico laboratorial da FMB, no grupo de soroconversões, em amostra de soro e coágulo sanguíneo, analisadas no LRIAL entre 2005 e 2012.

A) <i>ompA</i> -SYBR				B) <i>gltA-TaqMan</i> ®			
Tipo de amostra biológica	Soro			Tipo de amostra biológica	Soro		
	(+)	(-)	Total		(+)	(-)	Total
(+)	0	0	0	(+)	2	0	2
Coágulo (-)	4	5	9	coágulo (-)	2	5	7
Total	4	5	9	Total	4	5	9

Com relação às biópsias de lesão (pele) no grupo de óbitos (n=29), na comparação entre os protocolos de PCR em tempo real não houve concordância entre *ompA*-SYBR e *gltA-TaqMan*®, com kappa= 0,065, p=0,326 e intervalo de confiança 95% entre 0,193 e -0,064 (**Tabela 14**).

**Tabela 14.** Comparação entre os protocolos de PCR em tempo real *ompA*-SYBR e *gltA-TaqMan*® utilizados para o diagnóstico laboratorial da FMB, no grupo de óbitos, em amostras de biópsia de pele analisadas no LRIAL entre 2005 e 2012.

Protocolos de qPCR avaliados	<i>ompA</i> -SYBR		
	(+)	(-)	Total
(+)	1	14	15
<i>gltA-TaqMan</i> ® (-)	0	14	14
Total	1	28	29

Para análise de concordância de resultados entre amostras biológicas do tipo soro e pele, foram considerados como amostras positivas no soro apenas aquelas que tiveram resultado concordantes nos dois protocolos *ompA*-SYBR e *gltA*-TaqMan®. Foram excluídos da análise dois casos com RNase P negativa no soro.

A análise de 27 casos resultou em baixa concordância de resultados quando soro foi comparado com a pele, para o protocolo *ompA*-SYBR ( $\kappa=0,106$ ,  $p=0,219$ , intervalo de confiança 95% entre 0,275 e -0,063).

A análise de concordância de resultados entre soro e pele utilizando o protocolo *gltA*-TaqMan® apresentou  $\kappa=0,702$ ,  $p<0,001$ , intervalo de confiança 95% entre 1,0 e 0,329 (**Tabela 15**).

**Tabela 15.** Comparação dos protocolos de PCR em tempo real *ompA*-SYBR (**A**) e *gltA*-TaqMan® (**B**) utilizados para o diagnóstico laboratorial da FMB, no grupo de óbitos, em amostra de soro e pele, analisadas no LRIAL entre 2005 a 2012.

**A) *ompA*-SYBR**

Tipo de amostra biológica	Soro		
	(+)	(-)	Total
(+)	1	0	1
Pele (-)	10	16	26
Total	11	16	27

**B) *gltA*-TaqMan®**

Tipo de amostra biológica	Soro		
	(+)	(-)	Total
(+)	10	3*	13
pele (-)	1	13	14
Total	11	16	27

\* Todos com CT>36

Na análise dos valores de CT obtidos nas amostra de soro e pele não foi observada diferença significativa entre os tipos de amostra para o protocolo *gltA*-TaqMan® ( $30,60\pm 3,41$  e  $30,20\pm 3,39$  respectivamente,  $p=0,814$ ). Foi realizado teste t pareado, bicaudal ( $n=10$ ).

Na **Tabela 16** pode se observar o resumo dos resultados obtidos através de cada técnica para o diagnóstico da FMB nos grupos estudados.

**Tabela 16.** Resultados obtidos em cada uma das técnicas disponíveis para o diagnóstico da FMB, nas diferentes espécimes biológicas, nos grupos analisados no LRIAL entre 2005 a 2012.

Método	grupo	Espécime Biológica					
		soro		coágulo		pele	
		positivo (%)	negativo (%)	positivo (%)	negativo (%)	positivo (%)	negativo (%)
RIFI	óbitos	164 (40,0)	246 (60,0)	NA	NA	NA	NA
	soroconversões	84 (100,0)	0 (0,0)	NA	NA	NA	NA
	soronegativos	0 (0,0)	45 (100,0)	NA	NA	NA	NA
	controles	0 (0,0)	25 (100,0)	NA	NA	NA	NA
ISO*	óbitos	NA	NA	8(13,1)	53(86,9)	2(6,9)	27(93,1)
	soroconversões	NA	NA	0(0,0)	9(100,0)	NA	NA
	soronegativos	NA	NA	0(0,0)	39(100,0)	NA	NA
	controles	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>gltA-TaqMan</i>	óbitos	121(29,5)	289(70,5)	26(42,6)	35(57,4)	15(51,7)	14(48,3)
	soroconversões	18(21,4)	66(78,6)	2(22,2)	7(77,8)	NA	NA
	soronegativos	2(4,4)	43(95,6)	1(2,6)	38(97,4)	NA	NA
	controles	1(4,0)	24(96,0)	NA	NA	NA	NA
<i>ompA-SYBR</i>	óbitos	112(27,3)	298(72,7)	7(11,5)	54(88,5)	1(3,4)	28(96,6)
	soroconversões	15(17,9)	69(82,1)	0(0,0)	9(100,0)	NA	NA
	soronegativos	0(0,0)	45(100,0)	0(0,0)	39(100,0)	NA	NA
	controles	0(0,0)	25(100,0)	NA	NA	NA	NA
RNase P humana	óbitos	398(97,1)	12(2,9)	59(96,7)	2(3,3)	29(100)	0(0,0)
	soroconversões	84(100,0)	0(0,0)	9(100,0)	0(0,0)	NA	NA
	soronegativos	45(100,0)	0(0,0)	39(100,0)	0(0,0)	NA	NA
	controles	25(100,0)	0(0,0)	NA	NA	NA	NA

**RIFI**=sorologia pela reação de Imunofluorescência indireta; **ISO**= isolamento de riquetsias do Grupo Febre Maculosa em cultura celular; ***gltA-TaqMan***= protocolo de PCR em tempo real para detecção de *Rickettsia* spp; ***ompA-SYBR***= protocolo de PCR em tempo real para detecção de *Rickettsia* spp do Grupo Febre Maculosa; **RNase P humana**= protocolo de PCR em tempo real para detecção do controle interno endógeno.\*Estão incluídos entre os negativos os isolamentos que contaminaram.

## 5.5. Especificidade e Sensibilidade da PCR em tempo real para FMB

Para avaliar a especificidade e sensibilidade analítica dos protocolos de PCR em tempo real, foram selecionadas 50 amostras de soro de casos fatais entre os anos de 2005 e 2007. Neste estudo preliminar, os ácidos nucléicos foram extraídos a partir de amostras de soros e foram avaliados empregando-se uma reação de *nested* PCR com gene alvo:17KDa (*htrA*), seguida de sequenciamento gênico do fragmento interno amplificado de 247pb (NASCIMENTO, et al., 2008); e o conjunto de três protocolos de PCR em tempo real real: *ompA*-SYBR, *gltA*-*TaqMan*® e RNaseP, denominado de FMPCR.

Foi observado 100% de concordância entre os protocolos de PCR em tempo real *ompA*-SYBR e *gltA*-*TaqMan*®. Apenas um caso não houve amplificação do controle interno endógeno (RNaseP). A concordância de resultados entre a *nested* PCR e a FMPCR foi de 80% (kappa 0,798,  $p < 0,001$ , com intervalo de confiança de 95% entre 1,0 e 0,527). Os dados podem ser visualizados na **Tabela 17**.

**Tabela 17.** Comparação entre os resultados obtidos empregando-se a *nested* PCR, seguida de sequenciamento gênico e a FMPCR (*ompA*-SYBR, *gltA*-*TaqMan*® e RNaseP) para o diagnóstico laboratorial da FMB em 50 amostras de soro de casos fatais analisados no LRIAL entre 2005 e 2012.

Tipo de metodologia aplicada	FMPCR		
	(+)	(-)	Total
(+)	19	0	19
<i>nested</i> PCR (-)	5	26	31
Total	24	26	50

Para avaliação da especificidade e sensibilidade da FMPCR foram considerados casos positivos apenas aqueles que apresentaram curva de amplificação detectada nos 3 protocolos (*ompA*-SYBR, *gltA*-*TaqMan*® e RNaseP), e amostra biológica tipo soro.



Os “verdadeiros” positivos e negativos foram selecionados fundamentando-se nos resultados de outros ensaios de detecção etiológica realizados no IAL como: isolamento do agente em cultura, reação de imunohistoquímica em material parafinado (IHQ) e PCR. As informações sobre os exames foram localizadas no sistema de gestão laboratorial SIGH-IAL.

A concordância entre os resultados da FMPCR e outros exames de detecção etiológica realizados no IAL foi de 100% no grupo estudado, sendo 36 positivos e 39 negativos ( $\kappa=1,0$ ,  $p<0,001$ , intervalo de confiança de 95% entre 1,0 e 0,774) (**Tabela 18**).

**Tabela 18.** Comparação entre os resultados obtidos pela FMPCR e outras técnicas de detecção etiológica (IHQ, ISO e qPCR), no grupo de casos fatais selecionados para avaliação da sensibilidade e especificidade da PCR em tempo real para o diagnóstico da FMB, analisados no LRIAL entre 2005 a 2012.

Tipo de metodologia aplicada	Detecção Etiológica por IHQ, ISO ou qPCR		
	(+)	(-)	Total
(+)	36	0	36
FMPCR (-)	0	39	39
Total	36	39	75

FMPCR= três protocolos (*ompA*-SYBR, *gltA*-*TaqMan*® e RNaseP), em amostra de soro; IHQ= reação de imunohistoquímica em material parafinado; ISO=isolamento em cultura celular; qPCR= PCR em tempo real.

## 5.6. Comparação dos resultados da FMPCR e outros exames realizados no IAL

Para análise comparativa com outros exames, foram utilizados dados da FMPCR (*ompA*-SYBR, *gltA*-*TaqMan*® e RNaseP) em amostras de soro.

Foram considerados positivos para FMB casos com curva de amplificação detectada nos três protocolos.

No grupo de óbitos, a comparação entre os resultados da sorologia para FM pela RIFI e a FMPCR revelou baixa concordância entre os resultados, com  $\kappa=0,157$   $p=0,001$ , intervalo de confiança de 95% entre 0,253 e 0,06 (**Tabela 19**).

**Tabela 19.** Comparação entre resultados obtidos empregando-se FMPCR e sorologia pela RIFI para FMB, em amostras de soro de pacientes que evoluíram para o óbito, analisadas no LRIAL entre 2005 e 2012.

Tipo de metodologia aplicada	FMPCR			
	(+)	(-)	Total	
Sorologia RIFI	(+)	40	63	103
	(-)	70	237	307
Total	110	300	410	

FMPCR= três protocolos (*ompA*-SYBR, *gltA*-TaqMan® e RNaseP).

No grupo de soroconversões a análise no soro de fase aguda mostrou 15 de 84 casos (17,86%) positivos pela FMPCR, ou seja, a FMPCR deixou de detectar 69 casos que soroconverteram na RIFI para riquetsias GFM.

Não houve casos positivos pela FMPCR em amostra de soro de fase aguda entre as soroconversões procedentes do Estado de Santa Catarina, entre os 38 casos analisados.

Nos grupos de soronegativos e controles hígidos, os resultados da FMPCR apresentaram concordância em 100% com os resultados da sorologia para FMB, com ausência de casos positivos em ambas as metodologias.

No grupo de pacientes que evoluíram para o óbito, os 10 casos com isolamento para riquetsias GFM positivos também foram positivos na FMPCR nos respectivos soros. Desses, sete coágulos foram positivos na FMPCR (70%).

Entre os isolamentos negativos ou contaminados, 18 casos foram positivos na FMPCR no soro, os mesmos foram positivos também no coágulo pelo protocolo *gltA-TaqMan*® e apenas 33,3% foram positivos também no protocolo *ompA*-SYBR.

Em 2 casos as amostras de biópsia de pele apresentaram curva de amplificação com  $CT \geq 36$  no protocolo de PCR em tempo real *gltA-TaqMan*®, porém apresentaram exames positivos para *Neisseria meningitidis* sorogrupo C pela PCR em tempo real.

Em um caso a biópsia de pele apresentou curva de amplificação ( $CT=39$ ) apenas no protocolo *gltA-TaqMan*®, porém a hemocultura foi positiva para estreptococos.

Em um caso fatal o soro foi positivo pela FMPCR e positivo no tecido de autópsia parafinado pela IHQ para FM, porém foi positivo no sangue para estreptococos (qPCR,  $CT=39$ ).

Em um caso fatal o soro foi positivo pela FMPCR e positivo no tecido de autópsia parafinado pela IHQ para FM, porém foi isolado estreptococos no líquido (técnica de PCR em tempo real com  $CT$  não informado no SIGH).

Em relação aos resultados das sorologias, de maneira geral, a pesquisa de anticorpos específicos no soro, independente da técnica (ELISA, aglutinação ou RIFI) não apresentou boa correlação com os resultados da detecção etiológica.

No caso da leptospirose, de 21 casos com soroprecipitação reagente para leptospirose, 10 casos foram positivos para FMPCR no soro; e de 23 casos com IgM reagente, dois casos foram positivos tanto pela FMPCR no soro, quanto pela IHQ para FMB em material parafinado.

Entre os casos fatais com sorologia pela RIFI positiva para FMB (103 casos com IgG e/ou IgM  $\geq 128$ ), técnicas de detecção etiológica identificaram: um caso foi positivo para Influenza, dois para dengue, nove para leptospirose e dez para doença meningocócica.

## 5.7. Análise descritiva dos casos confirmados pela FMPCR

A distribuição dos casos confirmados pela FMPCR por sexo mostrou prevalência do sexo masculino tanto no grupo de óbitos como nas soroconversões. Entre os pacientes que evoluíram para o óbito, a distribuição por faixa etária a maior frequência foi entre 30-59 anos, já no grupo de soroconversões foi entre 0-9 anos (**Tabela 20**).

**Tabela 20.** Casos de FMB confirmados pela PCR em tempo real, distribuídos de acordo com sexo e faixa etária, nos grupos de óbitos e soroconversões analisados no LRIAL entre 2005 e 2012.

Variáveis	Óbitos n(%)	Soroconversões n(%)
Feminino	21 (18,5)	3 (20,0)
Masculino	93 (81,5)	12 (80,0)
Média das idades ± DP (intervalo)	38,0±17,0 (3-71)	29,7±23,1 (1-64)
0 a 9	6 (5,3)	5 (33,3)
10 a 19	14 (12,3)	1 (6,7)
20 a 29	14 (12,3)	1 (6,7)
30 a 39	22 (19,3)	3 (20,0)
40 a 49	24(21,1)	1 (6,7)
50 a 59	21 (18,4)	2 (13,3)
60 a 69	9 (7,9)	2 (13,3)
70 a 79	2 (1,7)	0 (0)
80 a 89	0 (0)	0 (0)
não informado	2 (1,7)	0(0)
Total	114	15

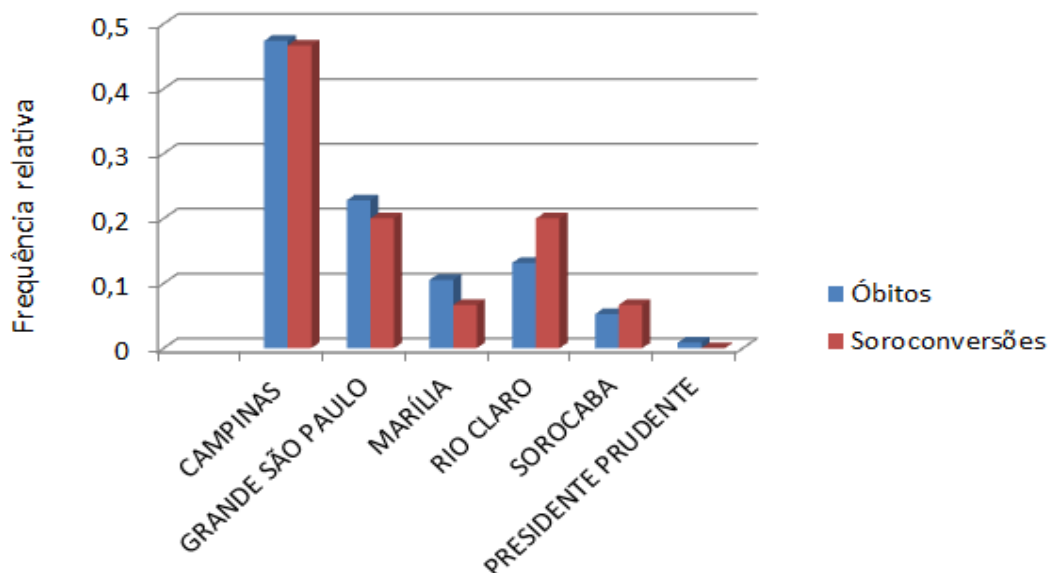
DP= desvio padrão, n= número amostral absoluto, (%) valor em porcentagem. Fonte: Informações obtidas das requisições dos exames e SIGH-IAL

Com relação à distribuição da procedência por região geográfica, os casos foram classificados de acordo com a unidade do IAL regional responsável pelo envio da amostra para o exame. Observou-se predomínio das principais regiões endêmicas para FMB no Estado de São Paulo: Campinas (n=61), Marília (n=13), Rio Claro (n=18), Sorocaba (n=7), Presidente Prudente (n=1) e Grande São Paulo (n=20) (**Gráfico 13**).

Os municípios inclusos na Grande São Paulo corresponderam à: Cotia (n=1), Diadema (n=3), Guarulhos (n=1), Itapevi (n=1), Mauá (n=1), Santo André (n=3), São Bernardo do Campo (n=6), São Paulo (n=13).

Entre os casos de FMB confirmados pela sorologia, com evolução benigna do Estado de Santa Catarina não houve positivos pela FMPCR (0/38).

**Gráfico 13.** Casos de FMB confirmados pela PCR em tempo real distribuídos por unidade do IAL regional responsável pelo envio da amostra clínica para o exame, nos grupos de óbito e soroconversões analisados no LRIAL entre 2005 e 2012.



Fonte: Informações obtidas da requisição do exame e SIGH-IAL.

O intervalo entre a apresentação da doença (deteção dos primeiros sintomas) e a coleta da primeira amostra para diagnóstico laboratorial foi menor nos casos confirmados pela FMPCR em comparação com os casos negativos pela FMPCR, no grupo de óbitos (*Mann-Whitney*,  $p=0,027$ ), mas não no grupo de soroconversões (Teste t, bicaudal, não pareado,  $p=0,162$ ) (**Tabela 21**).

**Tabela 21.** Casos de FMB confirmados pela PCR em tempo real de acordo com o tempo transcorrido entre o início dos sintomas da doença e a coleta de amostra biológica para diagnóstico da FMB, analisados no LRIAL entre 2005 e 2012.

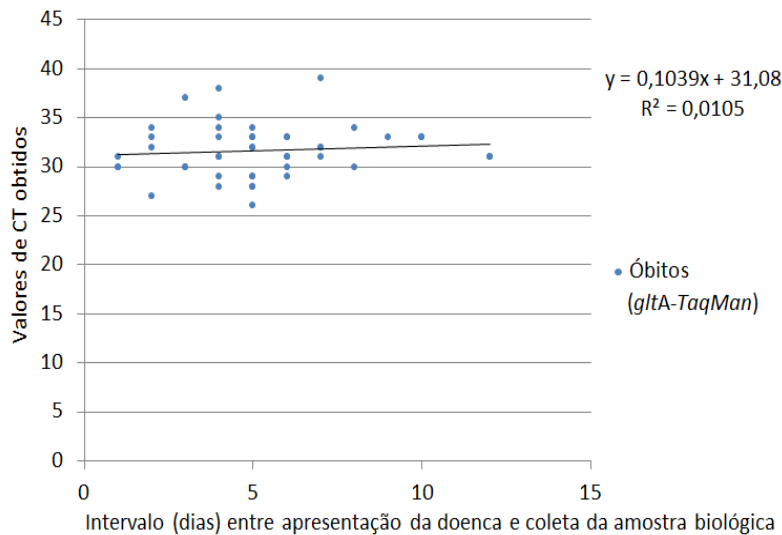
$\Delta T$ (dias)	Desfecho do caso			
	Óbitos		Não óbito (Soroconversões)	
	qPCR positivo	qPCR negativo	qPCR positivo	qPCR negativo
Média	5,2	6,7	4,87	6,09
Mediana	5	5	4	6
Desvio Padrão	2,73	8,6	2,75	3,53
Intervalo Máximo	20	84	12	14
Intervalo Mínimo	1	1	1	1
Com Informação (n)	102	231	15	65
Sem Informação (n)	12	65	0	4

$\Delta T$ = intervalo de tempo, em dias, entre os primeiros sintomas detectados e a coleta da primeira amostra para diagnóstico da FMB. Fonte: Requisição do exame e SIGH-IAL.

Foi registrado apenas um caso com intervalo de 20 dias entre o início dos sintomas da doença e a coleta da amostra biológica para diagnóstico de FMB, o restante dos casos não apresentou intervalo maior que 12 dias.

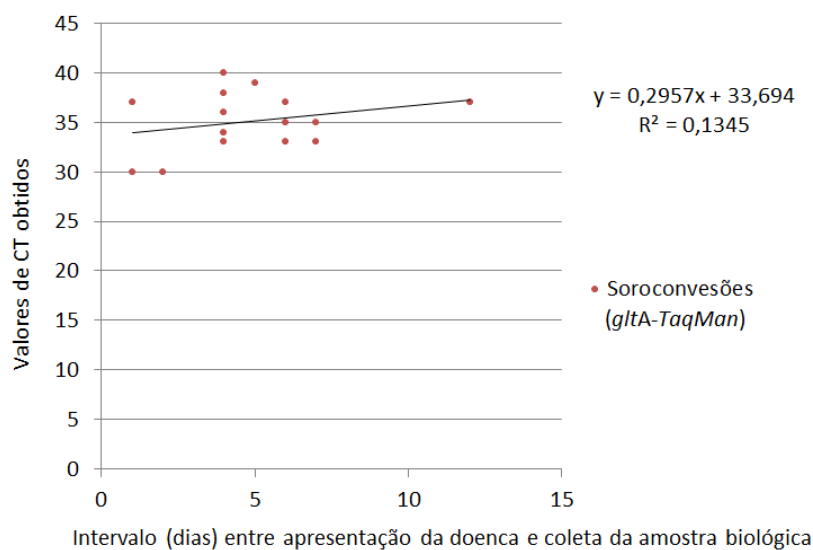
Não foi observada correlação entre os valores de CT e o intervalo entre a apresentação da doença e a coleta das amostras biológicas, tanto no grupo de óbitos como no grupo de soroconversões (**Gráficos 14 e 15**).

**Gráfico 14.** Valores de CT dos casos de FMB confirmados pelo protocolo de PCR em tempo real *gltA-TaqMan*® em relação ao intervalo entre a apresentação da doença e a coleta da primeira amostra biológica para diagnóstico de FMB, no grupo de pacientes que evoluíram para o óbito analisados no LRIAL entre 2005 e 2012.



CT= número do ciclo onde o sinal de amplificação cruzou o limiar de referência (*threshold*).

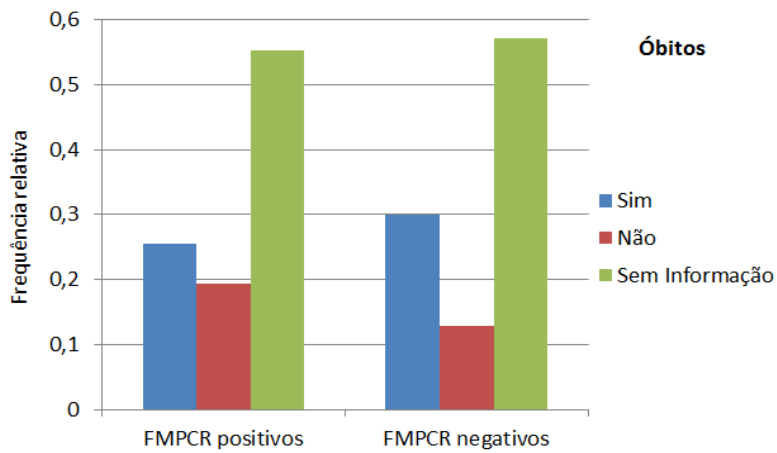
**Gráfico 15.** Valores de CT dos casos de FMB confirmados pelo protocolo de PCR em tempo real *gltA-TaqMan*® em relação ao intervalo entre a apresentação da doença e a coleta da primeira amostra biológica para diagnóstico de FMB, no grupo de soroconversões, analisados no LRIAL entre 2005 e 2012.



CT= número do ciclo onde o sinal de amplificação cruzou o limiar de referência (*threshold*).

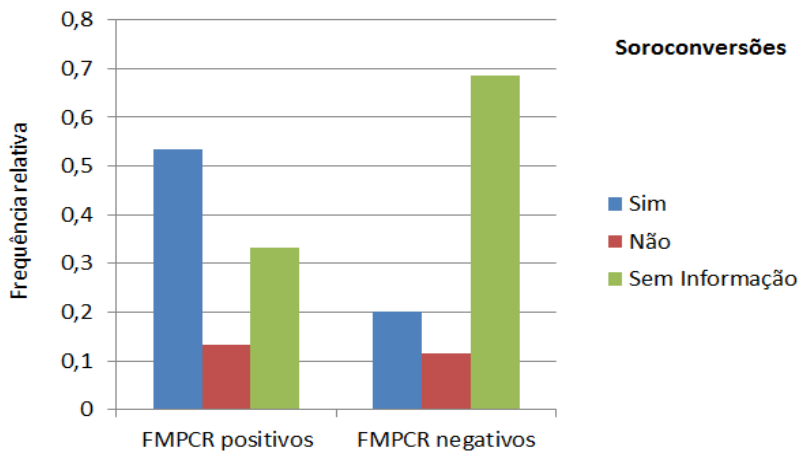
Quanto ao uso de antibiótico no grupo de soroconversões, a maior frequência de uso de antibiótico notificado foi entre os casos FMPCR positivos em relação aos negativos ( $\chi^2$  com  $p=0,008$ ) (**Gráfico 17**).

**Gráfico 16.** Frequência de casos fatais com suspeita clínica de FMB distribuídos de acordo com o resultado da PCR em tempo real para FMB, em relação à informação sobre o uso de antibiótico no tratamento do paciente analisados no LRIAL entre 2005 e 2012.



Fonte: Requisições dos exames e SIGH-IAL.

**Gráfico 17.** Frequência de casos de soroconversões para FMB distribuídos de acordo com o resultado da PCR em tempo real para FMB, em relação à informação sobre o uso de antibiótico no tratamento do paciente analisados no LRIAL entre 2005 e 2012.

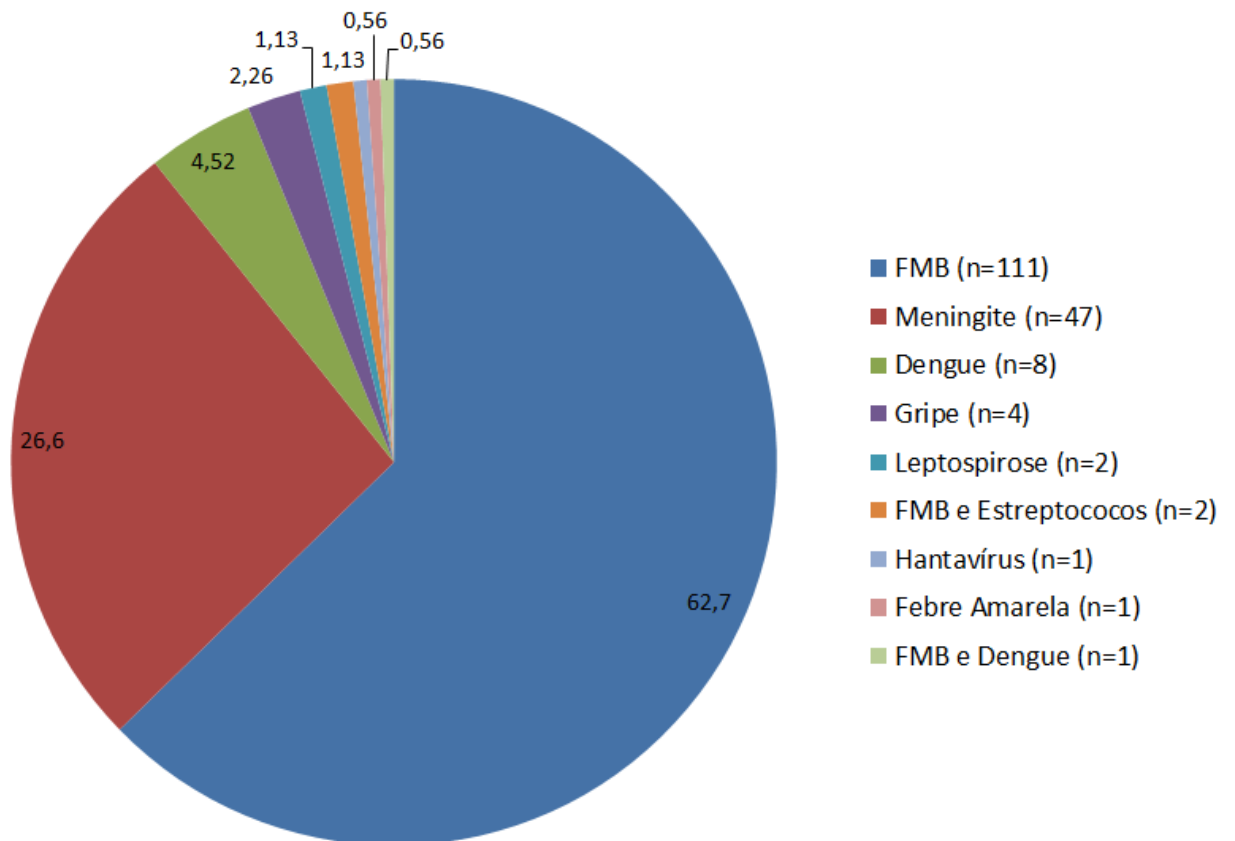


Fonte: Requisições dos exames e SIGH-IAL.



No grupo de óbitos com suspeita clínica de FMB, a distribuição dos casos com diagnóstico confirmados por técnicas de detecção etiológica (IHQ, ISO e qPCR) mostrou maior número de casos confirmados para FMB (n=111), seguido por meningites (estreptococos e neissérias) (n=47), dengue (n=8) e gripe (n=4). Em três casos, o diagnóstico etiológico foi confirmado para dois agentes infecciosos: FMB e estreptococos (n=2) e FMB e Dengue (n=1) (**Gráfico 18**).

**Gráfico 18.** Casos fatais com suspeita clínica de FMB e outras patologias que compõem o diagnóstico diferencial da FMB, distribuídas de acordo com a detecção etiológica confirmada, analisados no LRIAL entre 2005 e 2012.



Fonte: SIGH-IAL. Valores em porcentagem (%), n= valor amostral absoluto.

## 6. Discussão

O Instituto Adolfo Lutz foi fundado em 26 de outubro de 1940 e desde então é o principal laboratório de saúde pública do Estado de São Paulo e um dos três mais importantes do país. Entre os importantes e históricos serviços à saúde pública por ele prestados está o do Laboratório de Riquetsias.

O Laboratório de Riquetsias do IAL (RIAL) é referência regional para o diagnóstico da Febre Maculosa reconhecido pelo Ministério da Saúde e atende as principais regiões endêmicas do país, que atualmente se encontram no Estado de São Paulo e Santa Catarina.

Até o momento, a todos os casos suspeitos de FMB no Estado de São Paulo são encaminhados ao LRIAL para realização do diagnóstico laboratorial da FMB. No ano de 2012 foram realizados 1852 exames de sorologia para FMB pela técnica de RIFI (IgG e IgM), onde 333 exames foram reagentes (IgG ou IgM $\geq$ 64). Foram realizados ainda 117 exames de isolamentos em amostras de coágulos (105/117) e em biópsia de pele (12/117), sendo 7 casos positivos. Dos casos analisados, 174 foram suspeitos de FMB que evoluíram para óbito nesse ano.

De acordo com CVE-SP no ano de 2012, até fevereiro de 2013 (SINANET/Zoonoses/CVE/CCD/SES-SP) foram confirmados 68 casos de FMB no Estado de São Paulo, destes 37 foram casos fatais resultando em taxa de letalidade média de 54,4%.

A observação de alguns casos negativos na sorologia pela técnica de RIFI (IgG e IgM $<$ 64) com isolamento positivo para riquetsias do GFM em cultura de células foi o que motivou a realização do primeiro trabalho do grupo de FMB do IAL com técnicas moleculares para diagnóstico de casos fatais em amostras de soro (NASCIMENTO *et al.*, 2009). Em 2009, após a implementação da PCR em tempo real para diagnóstico do vírus Influenza A(H1N1)pdm09, foi possível substituir a técnica inicial de *Nested* PCR pela

PCR em tempo real mantendo excelentes resultados e melhorando a capacidade analítica, segurança e agilidade no resultado.

Neste estudo três protocolos de PCR em tempo real foram aplicados em amostras de 4 grupos distintos para avaliar sua sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da FMB.

O primeiro grupo foi composto por pacientes com suspeita clínica de FMB que evoluíram para o óbito. Esse grupo compõe o principal alvo de aplicação da PCR em tempo real para FMB uma vez que, até então, a ferramenta diagnóstica disponível na maioria dos casos era a sorologia pela técnica de RIFI, com pesquisa de IgG e IgM em amostra única de soro da fase aguda da doença. A demora no aparecimento dos anticorpos específicos para FMB em relação à rápida evolução da doença e desfecho letal nos casos graves é o fator determinante para que não haja tempo suficiente para que ocorra a soroconversão não permitindo a confirmação sorológica dos casos, causando uma imprecisão no diagnóstico sorológico nesse grupo.

Em praticamente 100% dos casos fatais com suspeita clínica e/ou epidemiológica de FMB são encaminhadas ao LRIAL amostras biológicas para o diagnóstico sorológico para FMB. A grande maioria destas amostras é composta por soro colhido antes ou logo após o óbito. Em cerca de 10% dos casos há também o envio de amostras biológicas para isolamento de riquetsias GFM em meio de cultura de células e em 30% dos casos há envio de material apropriado com solicitação para reação de imunohistoquímica para FMB em tecido obtido durante a autópsia.

No grupo de pacientes que evoluíram para o óbito foram observadas as primeiras evidências de falha diagnóstica na sorologia para FMB, quando foram detectados casos com isolamento positivo e sorologia negativa, sugerindo que um método molecular de detecção etiológica seria útil como diagnóstico complementar nesses casos.

O segundo grupo foi de soroconversões confirmadas pela sorologia para FMB empregando-se a RIFI em amostras pareadas. Esse grupo foi composto por casos de FMB confirmados que evoluíram para a cura. A seleção deste grupo teve como objetivo avaliar a eficiência da PCR em tempo real para detectar casos de FMB de gravidade variável em amostras de soro colhidas na fase aguda da doença. Ou seja, avaliar a PCR em tempo real como ferramenta de diagnóstico precoce potencialmente útil como apoio laboratorial na condução do paciente. Neste grupo foram selecionados casos onde a primeira amostra resultou em não reagente pela técnica de RIFI (IgG<64), para garantir que a coleta tenha sido feita na fase aguda da doença, o mais precoce possível.

Com relação à gravidade da doença, os casos do Estado de São Paulo representaram os casos mais graves e os de Santa Catarina representam os menos graves, sem registro de óbitos. A gravidade da doença é um ponto importante na detecção etiológica do agente na FMB, pois quanto maior a gravidade da doença, mais intensa é a vasculite, que é o substrato fisiopatológico da doença. A intensidade da vasculite está associada à quantidade de bactérias e/ou ácidos nucleicos no sangue e a possibilidade da sua detecção por técnicas moleculares.

O terceiro grupo foi de soronegativos e foi constituído por pacientes que tiveram a suspeita clínica e/ou epidemiológica de FMB, porém foi descartada pela sorologia não reagente para FMB em amostras pareadas de soro coletados com intervalo maior ou igual a 15 dias (IgG<64). Embora os sintomas iniciais da FMB sejam inespecíficos muitas vezes a suspeita da doença é estabelecida precocemente, principalmente nas regiões endêmicas, porém não confirmada posteriormente pela sorologia. Este grupo foi selecionado com a finalidade de avaliar o valor preditivo negativo da PCR em tempo real em relação à sorologia para riquetsias do GFM, uma vez que a sorologia em amostras pareadas é atualmente o padrão ouro para diagnosticar laboratorialmente a FMB (LA SCOLA e RAOULT, 1997).

O quarto grupo foi composto por indivíduos hígidos e com sorologia para riquetsias do GFM negativa em amostras pareadas. Este grupo foi selecionado com objetivo de avaliar o valor preditivo negativo dos protocolos de PCR em tempo real para *Rickettsia* spp.

A análise descritiva dos pacientes com suspeita clínica e/ou epidemiológica de FMB (óbitos, soroconversões e soronegativos) mostrou predominância do sexo masculino, e idades entre 0 e 59 anos. Com relação à procedência dos pedidos de exame para diagnóstico laboratorial da FMB, se mantiveram com maior frequência as principais regiões endêmicas do Estado de São Paulo: Campinas, Grande São Paulo, Rio Claro, Sorocaba e Marília.

O protocolo clínico para tratamento dos casos suspeitos de FMB preconiza a antibioticoterapia específica e a coleta da primeira amostra de sangue para o diagnóstico laboratorial imediatamente após suspeita diagnóstica de FMB (CVE/CCD/SES-SP). No grupo de pacientes com suspeita clínica e/ou epidemiológica de FMB o intervalo de tempo entre a apresentação da doença (início dos primeiros sintomas) e a coleta da primeira amostra biológica para o diagnóstico laboratorial variou entre 5 e 6 dias, de acordo com as normatizações para FMB.

O uso de antibiótico deixou de ser informado em número significativo de pedidos de exame.

O diagnóstico clínico precoce da FMB é difícil, principalmente durante os primeiros dias da doença, quando as manifestações clínicas são comuns a outras doenças febris. A FMB é uma das doenças que integram a síndrome febril hemorrágica junto com outras etiologias como as observadas no presente estudo: dengue, leptospirose, hantavirose e meningococcemia. Nos casos fatais com acometimento do SNC a meningite meningocócica foi o principal diagnóstico diferencial encontrado no grupo estudado.

### ***Validação dos ensaios de PCR em tempo real***

Para avaliar os parâmetros de eficiência de um protocolo de PCR em tempo real é necessário que o *template* ou região gênica alvo da amplificação seja puro e quantificado. Em alguns casos existem padrões comerciais de *template* disponíveis no mercado, os quais garantem a pureza e a precisão na quantificação do valor absoluto em número de cópias.

Para casos em que não existem padrões comerciais há alternativa de se clonar o *template* em vetores plasmidiais, expandí-los, purificá-los e então quantificá-los, o que exige estrutura laboratorial apropriada.

A utilização de um *template* puro e quantificado é requisito necessário para que, através de uma curva padrão de concentração, *templates* em amostras clínicas possam ser quantificados com precisão, como nos ensaios para quantificação de carga viral.

No caso da FMB, apesar do caráter quantitativo da PCR em tempo real, os resultados são expressos de forma qualitativa, ou seja, presença ou ausência de curva de amplificação do *template*. Assim, alguns parâmetros podem interferir no valor absoluto do resultado, sem alterar o resultado final do ensaio. Essa é uma das razões pelas quais não se têm claramente definidos todos os parâmetros de validação que devem ser contemplados para um método de PCR em tempo real para pesquisa qualitativa de patógenos.

Para validação dos protocolos de PCR em tempo real buscou-se seguir a abordagem para métodos quantitativos adaptando-se à realidade da FMB. Já para avaliação do ensaio com relação à sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da FMB em amostras clínicas, foi utilizada uma abordagem para validação de métodos qualitativos.

Na avaliação da eficiência dos protocolos de PCR em tempo real para *Rickettsia* spp deve-se notar que não há um *template* puro e quantificado, mas sim DNA total de *Rickettsia rickettsii* extraído de co-cultivo em células

Vero. Com isso, não podemos excluir da análise da eficiência dos protocolos a possibilidade da interferência da matriz, que é constituída pelo genoma da *Rickettsia rickettsii* (exceto o *template*) juntamente com o DNA das células Vero. Pode-se observar nas curvas de amplificação dos protocolos *gltA-Taqman*® e *ompA-SYBR* (**Figuras 1 a 5**) um pequeno deslocamento para a direita no primeiro ponto da curva de concentração (amostra pura) em relação às outras diluições, sugerindo que há uma certa inibição ou interferência da matriz, com diminuição da precisão da quantificação quando for utilizado *template* de DNA total de *Rickettsia rickettsii* extraído de co-cultivo em células Vero. Esse efeito de inibição no ponto de maior concentração da curva também pode ser visualizado na curva de dissociação do protocolo *ompA-SYBR*.

Pode-se observar ainda na curva de concentração decrescente que as diluições 1:10<sup>-4</sup> e 1:10<sup>-5</sup> produziram valores de CT muito próximos (Ct) (**Tabela 5**), apesar da diferença 10 vezes na diluição do *template*. Esse efeito é muito comum na PCR em tempo real quando há pequeno número de cópias (*template*) na amostra amplificada, pois, devido à probabilidade de detecção na presença de baixo número de cópias, a distribuição dos resultados não é normal, mas segue a distribuição de Poisson.

A distribuição de Poisson prevê que em um grande número de repetições, contendo uma média de uma cópia do *template*, em cerca de 37% das repetições não haverá detecção alguma, em 37% das repetições haverá detecção de uma cópia e em 18% das repetições haverá detecção de duas cópias (**Anexo IV**). Assim, para uma detecção confiável na presença de baixo número de cópias é necessário um grande número de repetições para fornecer significância estatística e para ultrapassar a limitação de distribuição de Poisson (**Application Note, ABI by Life Technologies, 2011**).

Essa imprecisão na detecção de baixo número de cópias interfere decisivamente na análise quantitativa, por isso o limite de quantificação é definido pelo último ponto (menor concentração) em que a linearidade da

curva permanece inalterada. Já o limite de detecção ainda permanece sem critérios de definição para detecção qualitativa de patógenos. Além do efeito da distribuição de Poisson, deve-se considerar a possibilidade de sinal fluorescente inespecífico quando o sinal de amplificação (Ct) estiver próximo do número total de ciclos do protocolo. Na maioria dos casos são estabelecidos algoritmos para diminuir a imprecisão para baixos números de cópias, como análise em duplicata ou triplicata, repetição de alguma fase do processamento, definição de interpretações diferentes de acordo com a faixa de Ct e, utilização de outro protocolo de PCR em tempo real para confirmar resultados duvidosos.

A curva de eficiência com *template* de valor absoluto conhecido (clones quantificados em número de cópias) já foi realizada pelos idealizadores dos protocolos utilizados neste estudo (EREEMEVA, *et al.* 2003, LABRUNA *et al.* 2004), a repetição da curva de eficiência teve como objetivo avaliar se a eficiência das reações se manteve equivalente nas condições gerais de processamento no IAL, como reagentes, equipamentos e pessoal técnico.

Na avaliação da curva de eficiência a concentração inicial do *template* foi estimada em  $10^{+7}$  número de cópias/mL para que pudessem ser feitas as análises estatísticas pelos softwares dos equipamentos. A inclinação das curvas para os protocolos *gltA-TaqMan®* e *ompA-SYBR* ficou entre  $-3,3 \pm 10\%$  refletindo uma eficiência de  $100\% \pm 10\%$ . Um resultado robusto, considerando que não foi utilizado um *template* puro, mas DNA extraído de cultura de riquétsias em célula Vero (**Tabela 5**).

Outro parâmetro crítico para avaliar a eficiência da PCR é o  $R^2$  (coeficiente de correlação), um termo estatístico que indica quão bom é um valor do CT em prever a quantidade de *template* inicial (**Application Note, Applied Biosystems™**). Este parâmetro correlaciona a fluorescência emitida e a concentração do *template*, e quanto mais próximo de 1 o valor de  $R^2$ , mais precisa será a quantificação de uma amostra desconhecida dentro da faixa de concentração analisada. O  $R^2$  das curvas para *gltA-TaqMan®* e



*ompA*-SYBR maior do que 0,95, o que corresponde a uma eficiência superior a 95% (**Tabela 5**). Apesar da alta eficiência registrada, não se pode descartar o efeito interferente da matriz uma vez que não se utilizou um *template* puro. O efeito interferente de matriz também foi observado por EREEMEVA (2003) para o protocolo *ompA*-SYBR.

O intercepto com eixo Y não será discutido, pois os valores não são reais uma vez que não foi utilizado *template* quantificado, mas com quantificação estimada.

Com relação à precisão, a repetição de um número suficiente de replicatas na PCR em tempo real apresenta uma distribuição normal, dentro da faixa linear da curva de eficiência. Com isso, 68% dos valores das replicatas devem ter valores de CT que variam dentro de um desvio padrão da média (raiz quadrada da variância), 95% devem variar dentro de 2 desvios padrão e 99,7% dentro de 3 desvios padrão. Quanto maior o desvio padrão, menor a capacidade de se distinguir a diferença de duas vezes (diluição 1:2) entre as amostras. A análise das 20 replicatas nas concentrações estimada de  $10^{+5}$  e  $10^{+4}$ , revelaram desvio padrão  $\leq 0,250$  (2 desvios padrão) para os protocolos *gltA-TaqMan*<sup>®</sup> e *ompA*-SYBR, o que corresponde a uma capacidade de discriminação entre uma diluição de 1:2 em mais de 95% dos casos (**Tabela 5**).

Na curva de eficiência, apesar dos valores de CT para o protocolo *gltA-TaqMan*<sup>®</sup> (aparelho ABI7500) se apresentarem maiores que os encontrados no protocolo *ompA*-SYBR (aparelho LC480 Roche), a inclinação da curva (*slope*) e  $R^2$  não indicam diferença de sensibilidade entre os protocolos (**Tabela 5**). Já na pesquisa em amostras biológicas pareadas o protocolo *gltA-TaqMan*<sup>®</sup> produziu valores de CT menores do que o protocolo *ompA*-SYBR, esse efeito pode ser explicado por pequenas diferenças na eficiência das reações identificadas na curva de concentração (97,7 e 96,18 para *ompA*-SYBR e *gltA-TaqMan*<sup>®</sup>, respectivamente) e pela interferência da matriz na pesquisa em amostras biológicas ser mais expressiva no protocolo *ompA*-SYBR do que no *gltA-TaqMan*<sup>®</sup>.

Os protocolos *ompA*-SYBR e *gltA*-TaqMan® mostraram-se robustos nos parâmetros analisados, porém sensíveis às diferenças entre os *master mix* comerciais. Esses dados indicam que esse tipo de reagente deverá ser testado na prática antes da aquisição de reagente de procedência diferente.

### ***Aplicação dos protocolos de PCR em tempo real nos grupos de estudo***

Apesar de não ter sido observada diferença de eficiência entre os protocolos *ompA*-SYBR e *gltA*-TaqMan® nos ensaios de validação, na pesquisa em amostras biológicas o protocolo *gltA*-TaqMan® mostrou-se mais sensível e tendendo à produzir CTs menores para as mesmas amostras (**Tabela 6**).

No grupo de óbitos, em amostras de soro 27,32% (112/410) foram detectados pelo protocolo *ompA*-SYBR, com CT médio de  $32,62 \pm 3,14$ , e 29,51% (121/410) foram detectados pelo protocolo *gltA*-TaqMan®, com CT médio de  $31,36 \pm 3,20$  (**Tabela 6**).

A Febre Maculosa Brasileira parece se apresentar de forma mais grave clinicamente quando comparada à Febre Maculosa das Montanhas Rochosas nos EUA (ANGERAMI, *et al.*, 2009). Dados provisórios do CVE-SES-SP para 2012 indicaram 54% de letalidade pela FMB, enquanto que em países como EUA a letalidade até 2009 foi menor que 5% (LIN e DECKER, 2012). Alguns fatores que podem estar favorecendo a ocorrência de casos graves no Brasil, como a demora na suspeita clínica, limitadas possibilidades terapêuticas e fatores associados aos vetores, a carga de riquétsias inoculada, suscetibilidade do hospedeiro e virulência das cepas. Essas diferenças com relação à maior gravidade e letalidade da doença no Brasil fazem com que as técnicas moleculares para detecção etiológica como PCR em tempo real tenham grande potencial como ferramenta diagnóstica em amostras de sangue ou soro (dos SANTOS, *et al.*, 2012). Em países da Europa, como a França, a PCR em tempo real tem se expandido como ferramenta diagnóstica para detectar riquetsioses de evolução benigna, porém com pouco sucesso em amostras de sangue e soro, mas com

excelente desempenho em amostras como biópsia de lesão cutânea ou swab da lesão provocada pela picada do carrapato (RENVOISÉ, *et al.*, 2012, KUROKAWA, *et al.*, 2012, TAMAKUMA, *et al.*, 2012, ANGELAKIS, *et al.*, 2012).

No grupo de pacientes que soroconverteram apenas 17,9 e 21,4% foram diagnosticados, em amostras de soro, pelos protocolos *gltA-TaqMan*<sup>®</sup> e *ompA-SYBR*, respectivamente (**Tabela 6**). Apesar do cuidado em selecionar amostras de paciente colhidas na fase aguda da doença (IgG<64), foi muito baixa a sensibilidade de ambos protocolos para detectar casos não fatais. Esses dados indicam baixo valor preditivo negativo da PCR em tempo real para FMB nesse grupo de pacientes e reforçam a necessidade da coleta da segunda amostra de soro para confirmar o resultado pela sorologia para FMB.

Acredita-se que no grupo de soroconversões existam casos com diferentes graus de gravidade da doença e, como a riquetsia GFM é uma bactéria intracelular, sua detecção em amostras periféricas como soro e sangue só é possível na ocorrência de maior agressão do endotélio, o que corresponde aos casos mais graves. Outro dado que reforça essa hipótese é a não detecção de riquetsias em ambos os protocolos nos casos com soroconversão procedentes do Estado de Santa Catarina, onde os casos são brandos e de evolução benigna, possivelmente causados por outra espécie de riquetsias do GFM, não *Rickettsia rickettsii*. Estudos futuros em casos não fatais de São Paulo e Santa Catarina estão sendo planejados para avaliar o impacto da PCR em tempo real em amostras de biópsia de lesão cutânea. O local da picada do carrapato é o alvo principal para coleta de amostra uma vez que é onde se concentra a maior quantidade de riquetsias (RENVOISÉ, *et al.*, 2012, KUROKAWA, *et al.*, 2012, TAMAKUMA, *et al.*, 2012, ANGELAKIS, *et al.*, 2012). Este estudo possibilitará avaliar o potencial da PCR em tempo real como ferramenta de diagnóstico precoce.

Considerando as mesmas informações sobre a relação entre a detecção pela PCR em tempo real e gravidade da doença, no grupo de

soronegativos, a detecção de curva de amplificação com CT altos (CT=38,5±2,12) em 2 casos pelo protocolo *gltA-TaqMan*® e não pelo protocolo *ompA-SYBR*, pode gerar dúvidas sobre a especificidade desse protocolo quando o CT for muito próximo de 40, não excluindo a possibilidade de sinal inespecífico (**Tabela 6**). O mesmo vale para o único caso positivo detectado exclusivamente pelo protocolo *gltA-TaqMan*® no grupo de controles hígidos.

No grupo de pacientes que soroconverteram, as amostras colhidas na fase de convalescença foram negativas em ambos os protocolos suportando a hipótese de que o período de bacteremia é curto e que a presença de títulos altos de anticorpos pode indicar que a amostra é tardia e o poder diagnóstico da PCR em tempo real para FMB está diminuído.

O protocolo da RNaseP humana funcionou bem como controle de qualidade interno endógeno em todas as amostras analisadas, incluindo soro, e em todos os grupos avaliados. Os *primers* e *probe* foram desenhados para amplificar RNA e DNA. O resultado da RNase P é um bom parâmetro para avaliar a qualidade da amostra e do seu processamento validando o resultado da PCR em tempo real para FMB. Observa-se que utilizando volume inicial fixo de amostra de 200µL, os CTs tendem a estar entre 25 e 35, exceto no grupo dos óbitos, que, como esperado, a vasculite causando lesão endotelial pode produzir valores mais dispersos tendendo à valores de CT menores e, em alguns casos CTs maiores ou até nulo, indicando dificuldades na extração ou não sucesso no processamento.

### ***Correlação entre os resultados de PCR em tempo real para *Rickettsia* spp nas amostras analisadas.***

Nas amostras enviadas para sorologia para FMB, predominantemente amostras de soro, foi observada forte correlação entre os resultados produzidos pelos protocolos de PCR em tempo real *gltA-TaqMan*® e *ompA-SYBR* em todos os grupos estudados.

Analisando os casos positivos apenas no protocolo *gltA-TaqMan*® observa-se que na maioria dos casos trata-se de reações que produziram CTs altos ( $\geq 37$ ). Apesar de não ter sido observadas diferenças de eficiência entre os protocolos *gltA-TaqMan*® e *ompA-SYBR* na fase de validação, observou-se que o protocolo *ompA-SYBR* sofre mais influência da matriz do que o protocolo *gltA-TaqMan*®. Um dos fatores que influenciam neste efeito é o tipo de fluoróforo utilizado em cada reação.

O SYBR Green é um intercalante de DNA, o sinal fluorescente captado pelo aparelho refere-se à produção de fitas duplas de DNA, as quais devido à especificidade dos *primers* correspondem à amplificação do fragmento desejado. As reações utilizando SYBR Green devem contemplar a análise da curva de dissociação (*melting*) para garantir que o sinal produzido refere-se exclusivamente ao fragmento desejado.

A curva de dissociação é um passo adicional no protocolo de PCR em tempo real, onde as fitas duplas do fragmento amplificado são aquecidas lentamente enquanto o sinal de fluorescência é captado, observa-se então o decaimento da fluorescência do SYBR Green.

O SYBR Green quando intercalado em fita dupla emite uma fluorescência 100 vezes maior do que quando está livre. Assim, com a dissociação das fitas, sua fluorescência diminui e o perfil de queda dessa fluorescência caracteriza o fragmento amplificado. Isso porque o tamanho do fragmento, a sua distribuição de nucleotídeos e a concentração de sais no meio definem a temperatura necessária para desnaturação (dissociação) deste fragmento.

Em uma reação de SYBR Green para que uma amostra seja considerada positiva, além do sinal de amplificação a temperatura de dissociação (TM) da amostra analisada deve coincidir com a temperatura de dissociação do controle positivo.

Devido às características deste fluoróforo intercalante, a reação de PCR em tempo real utilizando SYBR Green tende a sofrer mais interferência da matriz diminuindo sua sensibilidade. Alguns fatores identificados como interferentes na reação de SYBR Green são: alta concentração inicial de

ácido nucléico total em relação ao *template* da reação (o que varia de acordo com o tipo de amostra biológica, exemplo: soro, sangue total, coágulo, biópsia de pele, etc.) e variações nas concentrações finais de sais devido às dificuldades na extração do material genético dependendo do tipo de amostra biológica.

Já, as reações que utilizam sondas do tipo *TaqMan*<sup>®</sup> o sinal de amplificação do fragmento é mais específico, pois é necessário um pareamento perfeito da sonda com o fragmento amplificado para que o sinal seja emitido. A experiência prática neste estudo mostrou que esse tipo de reação, apesar de também ser influenciada pela qualidade da amostra extraída, sofre menos interferência da matriz do que a reação com SYBR Green, aparentando ser mais robusta com relação a esses interferentes.

Assim, pode-se prever que, na pesquisa em amostra clínica, quando CT produzido no protocolo *gltA-TaqMan*<sup>®</sup> for  $\geq 37$  é possível que haja falha na detecção da amplificação pelo protocolo *ompA-SYBR*. Para minimizar esse problema, no futuro o protocolo *ompA-SYBR* será substituído por um protocolo com detecção por *TaqMan*<sup>®</sup> (KATO, *et al.*, 2013).

Embora as riquetsias de impacto na saúde pública estejam no grupo da Febre Maculosa não podemos descartar totalmente a possibilidade de que uma amostra positiva no protocolo *gltA-TaqMan*<sup>®</sup> e negativa no protocolo *ompA-SYBR* tenha como agente etiológico uma riquetsias não GFM. Raramente, quando uma amostra é positiva apenas em um dos protocolos, repete-se a extração de ácido nucléico e a reação de PCR em tempo real.

Apesar de ser mais específico o sinal produzido pela sonda do tipo *TaqMan*<sup>®</sup>, quando o CT obtido for muito próximo do número total de ciclos do protocolo deve-se considerar a possibilidade da inespecificidade do sinal. Esse efeito não é comum, porém já foi identificado no protocolo *gltA-TaqMan*<sup>®</sup> em amostras de biópsia de pele, quando também foi detectado o agente etiológico meningococo. Nesse caso o resultado no protocolo *ompA-SYBR* foi negativo. Outra maneira de minimizar a interpretação errada do

resultado é repetí-lo em duplicata ou triplicata, geralmente o sinal inespecífico é aleatório e não tende a se repetir em todas as replicatas.

Com todas essas informações, observou-se que a utilização do protocolo *gltA-TaqMan*<sup>®</sup> juntamente com o protocolo *ompA-SYBR* melhoram o valor preditivo do ensaio para o diagnóstico da FMB aumentando a especificidade do ensaio.

### ***Correlação entre a positividade e o tipo de amostra***

Os dados obtidos das análises em diferentes amostras biológicas reforçam a idéia de que o protocolo *ompA-SYBR* sofre forte interferência da matriz. O soro foi a amostra clínica que produziu melhores resultados utilizando esse protocolo em comparação com o sangue total, coágulo e pele. Isso se deve ao fato do soro ser uma amostra de fácil e eficiente extração, com pouco ácido nucléico do hospedeiro favorecendo a recuperação do ácido nucléico do agente infeccioso, além disso, existem *kits* de extração de alta eficiência para este tipo de material. Já o sangue total e o coágulo tem um importante interferente, a hemoglobina. No coágulo, a necessidade de maceração, digestão por longo tempo, e muitas lavagens não garantem uma boa pureza e recuperação final do material genético.

A avaliação quantitativa, medida pelo valor do CT, entre as amostras biológicas evidencia certa inibição refletida obtenção de CTs maiores para amostras biológicas como coágulo e biópsia de pele em relação ao soro, Esses dados indicam diminuição da sensibilidade do protocolo *ompA-SYBR* para coágulo e biópsia de pele em relação ao soro.

O protocolo *gltA-TaqMan*<sup>®</sup> foi mais robusto, sofrendo menos influencia das diferentes matrizes, porém a análise quantitativa dos CTs obtidos também mostrou um grau de inibição quando soro foi comparado com sangue. O protocolo *gltA-TaqMan*<sup>®</sup> apresentou boa correlação entre resultados obtidos nas amostras de soro, sangue, coágulo e pele, apesar de também apresentar CTs menores em amostras de soro.

Embora o protocolo *gltA-TaqMan*<sup>®</sup> tenha sido eficiente para detectar casos positivos nas diferentes amostras biológicas, ele produziu resultados duvidosos em algumas amostras, principalmente de biópsia de pele, cujos CTs foram  $\geq 36$ .

Com essas informações pode-se dizer que, como o protocolo *gltA-TaqMan*<sup>®</sup> sofre menos interferência de matriz, na ausência de amostras de soro, o protocolo *gltA-TaqMan*<sup>®</sup>, mas não *ompA-SYBR*, pode ser utilizado como ferramenta de apoio para o diagnóstico da FMB, em outras amostras como sangue, coágulo e pele, porém resultados com  $CT \geq 36$  devem ser repetidos em duplicata ou triplicata.

A futura substituição do protocolo *ompA-SYBR* com detecção por SYBR Green por um protocolo com detecção por sonda tipo *TaqMan*<sup>®</sup> poderá minimizar esse problema de interferência da matriz. É recomendável que sejam utilizadas 2 regiões gênicas diferentes para confirmar um diagnóstico etiológico pela PCR em tempo real, principalmente na presença de baixo número de cópias do agente na amostra extraída.

### ***Especificidade e Sensibilidade dos protocolos de PCR em tempo real***

Para comparação entre as metodologias moleculares *Nested PCR* e PCR em tempo real foram analisadas 50 amostras de soro de casos fatais com suspeita clínica de FMB. Destes, 20 casos diagnosticados pela *Nested PCR* foram confirmados também pela PCR em tempo real nos protocolos *ompA-SYBR* e *gltA-TaqMan*<sup>®</sup>, e outros 5 novos casos foram detectados pela PCR em tempo real e não pela *Nested PCR* (25%). Nesse estudo houve 100% de concordância entre os resultados obtidos pelo protocolo *ompA-SYBR* e *gltA-TaqMan*<sup>®</sup>. Esses resultados apontam para uma sensibilidade e especificidade analítica adequadas para utilização da PCR em tempo real na detecção de casos fatais de FMB em amostras de soro.

Após seleção entre os casos fatais, foi possível compor um grupo de 36 casos “verdadeiros” positivos e 39 “verdadeiros” negativos confirmados



por diferentes técnicas na elucidação etiológica. Para esta avaliação, a PCR em tempo real para FMB, chamada de FMPCR foi composta por três protocolos: *ompA*-SYBR, *gltA*-*TaqMan*® e RNaseP humana. A concordância entre os resultados foi de 100% entre a FMPCR e outras técnicas de detecção etiológica (ISO, IHQ e qPCR). Esses dados demonstram a alta especificidade e sensibilidade da PCR em tempo real como ferramenta diagnóstica para elucidar casos fatais de FMB.

Atualmente em apenas cerca de 30% dos casos fatais com suspeita clínica de FM amostras de tecido são enviadas para o exame histopatológico e imunohistoquímico no IAL. Na grande maioria dos casos apenas amostras de soro são enviadas para o diagnóstico laboratorial da FMB. Neste cenário, a PCR em tempo real aplicada nas amostras de soro trouxe um avanço no diagnóstico da FMB e um impacto positivo na elucidação de casos fatais.

### ***Comparação dos resultados da FMPCR e outros exames realizados no IAL***

Diante da alta concordância dos resultados obtidos com os protocolos *ompA*-SYBR, *gltA*-*TaqMan*® e, da necessidade de se garantir a qualidade do processamento das amostras, foram considerados positivos para FMB casos com amplificação detectada nos 3 protocolos: *ompA*-SYBR, *gltA*-*TaqMan*® e RNaseP humana. A composição deste exame foi denominada de FMPCR, sigla já existente para o exame no SIGH-IAL.

A comparação dos resultados da FMPCR com a sorologia mostrou baixa correlação com ocorrência de falsos negativos e falsos positivos em relação à PCR em tempo real. Os falsos negativos são decorrentes da demora no aparecimento dos anticorpos específicos detectáveis no sangue pela sorologia para FMB em relação à rápida evolução da doença. Já os casos falsos positivos podem ter ocorrido devido a influências da imprecisão da técnica RIFI cuja variação na leitura pode ser de 1 a 2 títulos, a sensibilidade do antígeno utilizado e às reações inespecíficas. Essas variações da RIFI para FM são difíceis de serem superadas quando a

análise é feita em amostra única, provocando diminuição da sensibilidade e especificidade do exame.

A amostra de soro colhida tardiamente em relação ao início dos primeiros sintomas diminui a probabilidade de detectar riquetsias circulantes, pois o período de bacteremia é curto. Assim, quanto mais tardiamente a amostra for colhida menor será o valor preditivo negativo da FMPCR. Por outro lado, a RIFI para FMB tem uma relação inversa com a FMPCR, onde quanto mais tardia a coleta da amostra maior será o valor preditivo da RIFI para diagnosticar a FMB, pois a produção de anticorpos específicos tende a aumentar com o tempo.

No grupo de soroconversões, mesmo as amostras sendo colhidas precocemente (IgG>64), a FMPCR falhou em detectar cerca de 80% dos casos. Em parte esse resultado pode ser explicado pelos diferentes graus de gravidade da doença entre os pacientes que compõem este grupo, como já foi dito, a vasculite aguda é um fator determinante para a detecção do agente etiológico circulante. Outro fator determinante é tratamento específico iniciado precocemente impedindo a evolução da doença e favorecendo o desfecho de cura.

Outro fator que também deve ser considerado é que a sorologia pela RIFI detecta riquetsias GFM e, dentro do GFM existem riquetsias de patogenicidade diferentes (WOOD e ARTSOB, 2012). De acordo com UCHIYAMA, *et al.*, 2012 e UCHIYAMA, 2012, há uma relação entre a capacidade de crescimento em cultura de células de mamíferos e o grau de patogenicidade da espécie. Nesse estudo a espécie patogênica do GFM (*R. japônica*) apresentou taxa de replicação superior à espécie não patogênica (*R. montanensis*) e a co-infecção pelas duas espécies aumentou a taxa de crescimento da não patogênica.

As riquetsias do GFM de baixa patogenicidade tendem a proliferar-se intensamente no sítio de inoculação, ou seja, a picada do carrapato, e se distribuem sistemicamente de forma limitada e por pouco tempo. Isto pode ter implicações nos sintomas que variam de acordo com a gravidade, e são

influenciados pela carga de riquetsias inoculada, imunidade do hospedeiro e precocidade do tratamento específico (OTEO e PORTILLO, 2012).

Diante dessa realidade concluímos que em casos não fatais o diagnóstico somente poderá ser confirmado com segurança pela sorologia para FMB após o envio da segunda amostra de soro colhida na fase de convalescência. Apesar de a FMPCR apresentar baixa sensibilidade para casos não fatais, o resultado quando positivo confirma o caso precocemente e poderia auxiliar o clínico na condução do paciente, portanto deve ser considerada sua aplicação em casos graves indicados pelo CVE-SES-SP.

Os isolamentos para riquetsias GFM em cultura celular positivos produziram resultados concordantes com os da FMPCR em soro. Alguns casos com resultado negativo ou contaminado no isolamento apresentaram positividade no soro empregando-se a FMPCR. Nesses casos o protocolo *gltA-TaqMan*® confirmou o resultado positivo quando aplicado no coágulo. Como foi discutido anteriormente, o protocolo *ompA-SYBR* não foi eficiente para esse tipo de amostra.

Em dois casos o protocolo *gltA-TaqMan*®, em amostra de pele, produziu um resultado “falso” positivo, com  $CT \geq 36$ , pois os casos foram diagnosticados como agente etiológico *Neisseria meningitidis* do sorogrupo C. Nesses casos a pesquisa de FMPCR em amostra de soro produziu resultado mais específico, sendo negativa para FMB.

Em 2 casos com FMPCR e IHQ positivos para FMB a pesquisa para estreptococos foi positiva. Já foi descrito que casos graves de FMB podem levar a septicemia por outros agentes etiológicos (BACCI e NAMURA, 2012).

Com relação às sorologias, tanto a RIFI para FMB como soroaglutinação ou ELISA IgM para leptospirose, não apresentaram boa correlação com os resultados de detecção etiológica. Esses dados indicam que os resultados de sorologias para elucidação de casos fatais devem analisados com cuidado, considerando prioritariamente os resultados dos ensaios de detecção etiológica para esse grupo.

### ***Análise descritiva dos casos confirmados pela FMPCR***

A distribuição dos casos confirmados pela FMPCR por sexo mostrou prevalência do sexo masculino, resultado também encontrado por KATZ, *et al.* (2009) entre os anos de 2003 a 2008, em estudo epidemiológico da FMB no Estado de São Paulo. Com relação à faixa etária os casos apresentaram grande diversidade etária, com tendência de menor frequência acima de 59 anos.

As regiões geográficas com maiores ocorrências da doença corresponderam as já conhecidas consideradas endêmicas no Estado de São Paulo. Os dados referentes à provável localidade da infecção possuem imprecisão, pois se referem, em muitos casos, ao local de atendimento e solicitação do exame e não do local provável da infecção.

A média de intervalo de tempo transcorrido entre a apresentação da doença e a coleta da amostra biológica para diagnóstico da FMB foi menor nos casos positivos pela FMPCR. A média em intervalo de tempo nos casos positivos foi de 5 dias tanto para óbitos como para os casos com soroconversões. O intervalo de tempo máximo foi de 12 dias, com apenas um caso fatal excedendo os 12 dias (20 dias). Esses dados fortalecem a hipótese de que a FMPCR tem aplicação apenas no curto período de bacteremia da fase aguda da doença, e as amostras colhidas posteriormente a esse período não são adequadas para utilização na FMPCR.

Com relação aos valores de CT esperava-se que eles apresentassem correlação entre o tempo transcorrido entre a apresentação da doença e a coleta da amostra biológica, de forma que quanto menor fosse o tempo transcorrido entre eles menor seria o valor de CT esperado, ou seja, quanto mais precoce fosse a coleta da amostra, maior seria a quantidade de riquétsias circulantes. Isso não pode ser claramente visualizado, pois existem variáveis que podem interferir nessa correlação e devem ser consideradas, tais como: a carga de riquétsia inoculada, a resposta imune do paciente, o uso de antibióticos específicos, a dificuldade na extração da amostra, a falta de normalização das leituras, etc.

Sobre a utilização de antibiótico no tratamento do paciente, essa informação foi imprecisa decorrente do preenchimento inadequado ou ausente no formulário para requisição do exame. Como a informação sobre o uso de antibiótico não é uma informação restritiva para a realização do exame, muitas vezes é negligenciada. Outra questão que deve ser considerada é a ausência de informação sobre a especificidade do antibiótico utilizado.

No grupo de óbitos com suspeita clínica de FMB, a distribuição dos casos com diagnóstico confirmado pelas técnicas de detecção etiológica no IAL mostrou que as doenças que compõem o diagnóstico diferencial da FMB são meningites e meningococemias, seguidas por dengue e gripe. A leptospirose é também uma importante doença no diagnóstico diferencial da FM, porém no IAL o diagnóstico molecular para leptospirose ainda não foi implantado na rotina, sendo o diagnóstico etiológico realizado apenas pela reação de imunohistoquímica, em amostras de tecidos parafinados, em um número muito limitado de casos.

### **Considerações gerais**

Pontos positivos da utilização da PCR em tempo para o diagnóstico da FMB:

- Rapidez, sensibilidade e precisão para o diagnóstico dos casos fatais de FMB
- Aprimoramento na Vigilância de óbitos com suspeita da doença
- Melhor conhecimento do espectro da doença e seu impacto na saúde pública
- Apoio para as ações da Vigilância Epidemiológica na identificação das áreas de risco
- Eficiente e rápido diagnóstico diferencial entre meningites e encefalites
- Técnica simples e de fácil leitura do resultado
- Reprodutibilidade e robustez da técnica

Pontos negativos da PCR em tempo real para FMB:

- Insumos relativamente caros
- Alto custo para manutenção dos equipamentos
- Limitações do protocolo *ompA*-SYBR com relação às diferentes matrizes biológica.
- Limitações com relação ao curto período de bacteremia na FMB
- Limitações para detecção de caso não grave de FMB
- Limitação com relação à qualidade dos kits de extração e a composição do *master mix*

## **7. Conclusões**

O melhor desempenho da PCR em tempo real foi obtido na detecção de casos fatais de FMB, em amostras de soro, utilizando o protocolo combinado de três reações: *gltA-TaqMan*®, *ompA-SYBR* e RNaseP humana.

A PCR em tempo real para FMB apresentou baixa sensibilidade para detectar casos não fatais, confirmados pela sorologia.

Os resultados deste estudo indicam que a PCR em tempo real apresenta sensibilidade e especificidade que permitem utilizá-la como ferramenta laboratorial no diagnóstico da FMB para elucidação de casos fatais da doença.

## 8. Referências Bibliográficas

- Angelakis E, Richet H, Rolain JM, La Scola B, Raoult D. Comparison of real-time quantitative PCR and culture for the diagnosis of emerging Rickettsioses. **PLoS Negl Trop Dis.** 2012;6(3):e1540. doi: 10.1371/journal.pntd.0001540. Epub 2012 Mar 6.
- 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. **Clin Microbiol Infect.** 2009 15(s2):207-208. (doi: 101111/j.149-0691.2008.02160).
- Angerami RN, Câmara M, Pacola MR, Rezende RC, Duarte RM, Nascimento EM, Colombo S, Santos FC, Leite RM, Katz G, Silva LJ. Features of Brazilian spotted fever in two different endemic areas in Brazil. **Ticks Tick Borne Dis.** 2012 Dec;3(5-6):346-8. doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.10.010. Epub 2012 Oct 22.
- Application Note. Real-Time PCR: Understanding Ct. **Applied Biosystems™ by Life Technologies™, 2011.** [www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/Nucleic-Acid-Amplification-Expression-Profiling/PDFs.Par.70657.File.dat/Understanding Ct Application Note.pdf](http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/Nucleic-Acid-Amplification-Expression-Profiling/PDFs.Par.70657.File.dat/Understanding Ct Application Note.pdf)
- Bacci MR, Namura JJ. Association between sepsis and Rocky Mountain spotted fever. **BMJ Case Rep.** 2012 Dec 6;2012. pii: bcr2012007024. doi: 10.1136/bcr-2012-007024.



BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n 1943, de 18 de outubro de 2001. Define a relação de doenças de notificação compulsória para todo território nacional. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, v.10, n.1, p.35, 24 de outubro de 2001.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria n 70, de 23 de dezembro de 2004. Estabelece os critérios e a sistemática para habilitação de Laboratórios de Referência Nacional e Regional para as Redes Nacionais de Laboratórios de Vigilância Epidemiológica e Ambiental em Saúde. Oficial da União. Brasília, 23 de dezembro de 2004.

CDC REF.# 1-007-05. CDC Protocol of realtime RTPCR for swine influenza A(H1N1) World Health Organization, 28 April 2009, revision 1 (30 April 2009).

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.

Del Guercio VMF, Rocha MMM, Melles HHB, Lima VCL, Pignatti MG. Febre maculosa no município de Pedreira, SP, Brasil. Inquérito sorológico. **Rev Soc Bras Med Trop** 1997; 30: 47-52.

Dias E, Martins A V. Spotted fever in Brazil. **Am J Trop Med** 1939;19: 103-108.

dos Santos FC, do Nascimento EM, Katz G, Angerami RN, Colombo S, de Souza ER, Labruna MB, da Silva MV. Brazilian spotted fever: real-time PCR for diagnosis of fatal cases. **Ticks Tick Borne Dis.** 2012 Dec;3(5-6):312-4. doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.10.027. Epub 2012 Nov 16.

Eremeeva ME, Dasch GA, Silverman DJ. Evaluation of a PCR assay for quantitation of *Rickettsia rickettsii* and closely related spotted fever group rickettsiae. **J Clin Microbiol.** 2003 Dec;41(12):5466-72.

Favacho AR, Rozental T, Calic SB, Scofield MA, Lemos ER. Fatal Brazilian spotless fever caused by *Rickettsia rickettsii* in a dark-skinned patient. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2011 May-Jun;44(3):395-6.

Fleiss Joseph L. Statistical methods for rates and proportions. New York: John Wiley, 1981. p 212-236

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.

Galvão MA, Lamounier JA, Bonomo E, Tropaia MS, Rezende EG, Calic SB, Chamone CB, Machado MC, Otoni ME, Leite RC, Caram C, Mafra CL, Walker DH. Emerging and reemerging rickettsiosis in an endemic area of Minas Gerais State, Brazil. **Cad. Saude Publica.** 2002 Nov-Dec;18(6):1593-7. Portuguese.

Galvão MA, Silva LJ, Nascimento EM, Calic SB, Sousa Rd, 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. Review. Portuguese.

Gehrke FS, Angerami RN, Marrelli MT, de Souza ER, do Nascimento EM, Colombo S, da Silva LJ, Schumaker TT. Molecular characterization of mediterranean spotted fever rickettsia isolated from a European traveler in the state of São Paulo, Brazil. **J Travel Med**. 2013 Jan-Feb;20(1):54-6. doi: 10.1111/j.1708-8305.2012.00677.x

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, 82:127-134.

Horta MC, Labruna MB, Sangioni LA, Vianna, MC, Gennari, SM, Galvao MA, Mafra CL, Vidotto O, Schumaker TT, Walker DH. 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.

Informe técnico, 2011. Febre Maculosa Brasileira: Diagnóstico Laboratorial. **Bepa** 2011, Suplemento, v.8, nº1, Out/2011

Katz G, Camargo Neves VLF, Angerami RN, Nascimento EMM, Colombo S. Situação epidemiológica e importância da Febre Maculosa Brasileira no Estado de São Paulo. **Bepa** 2009; 6:4-13.

- Kato CY, Chung IH, Robinson LK, Austin AL, Dasch GA, Massung RF. Assessment of real-time PCR assay for detection of *Rickettsia* spp. and *Rickettsia rickettsii* in banked clinical samples. *J Clin Microbiol*. 2013 Jan;51(1):314-7. doi: 10.1128/JCM.01723-12. Epub 2012 Nov 7
- Kidd L, Maggi R, Diniz PPVP, Hegarty B, Tucker M, Breitschwerdt W. Evaluation of conventional and real time PCR assays for detection and differentiation of Spotted Fever Group *Rickettsia* in dog blood. **Veterinary Microbiology** 2008, 129: 294-303.
- Kurokawa I, Kondo M, Akachi S. Early diagnosis of Japan spotted fever by PCR using skin samples. **J Infect Chemother**. 2012 Dec 12.
- Landis, JR and Koch, GG. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**. 1977; 33:159-174.
- 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, Popov V, Gennari SM, Walker DH. *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.
- Leitner M, Yitzhaki S, Rzotkiewicz 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, Zaki, S R, Ferreira F C C, Ravagnani R C, Machado R D, Guimarães M A A M, Coura J R. 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: 329-334.

Lima V L C, Souza S A L, Souza C E, Vilela M F G, Santos M C G, Papaordanou P M O, Del Guercio V M D, Rocha M M M. A situação da febre maculosa na região administrativa de Campinas – SP. **I simpósio sobre doenças transmitidas por carrapatos** 2001 Campinas São Paulo.

Lin L, Decker CF. Rocky Mountain spotted fever. **Dis Mon.** 2012 Jun;58(6):361-9. doi: 10.1016/j.disamonth.2012.03.008.

Mancini DAP, Nascimento EMM, Tavares VR, Soares MA. A ocorrência de riquetsioses do grupo *Rickettsia rickettsii*. **Rev Saúde Public** 1983 17:493-499.

Mansueto P, Vitale G, Cascio A, Seidita A, Pepe I, Carroccio A, di Rosa S, Rini GB, Cillari E, Walker DH. New insight into immunity and immunopathology of Rickettsial diseases. **Clin Dev Immunol.** 2012; 2012:967852. doi: 10.1155/2012/967852. Epub 2011 Sep 6. Review.

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.

Melles HHB, Colombo S, Lemos ERS Isolamento de Rickettsia em cultura de células. **Rev Soc Bras Med Trop** 1999 32: 469-473.

Melles HHB, Colombo S, Silva MV. Febre maculosa: Isolamento de Rickettsia em amostra de biópsia de pele. **Rev Inst Med Trop** 1992.34: 37-41.

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**, 9:11-12, 2004.

Nascimento EMM, Colombo S, Nagasse-Sugahara TK, Angerami RN, Resende MR, da Silva LJ, Katz G, dos Santos FC. Evaluation of PCR-based assay in human serum samples for diagnosis of fatal cases of spotted fever group rickettsiosis. **Clin Microbiol Infect.** 2009 Dec;15 Suppl 2:232-4. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02153.x. Epub 2009 Apr 15.

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 100(3):277-279, 2005.

Ogrzewalska M, Santos FCP, Souza ER, Nascimento, EMM, Angerami RN, Labruna MB. Molecular characterization of rickettsial isolates from spotted fever fatal cases in the state of São Paulo, Brazil. In: III Congreso Latinoamericano de Enfermedades Rickettsiales, I Encuentro Nacional de Fiebres Hemorrágicas, 2011, Bogotá. **Biomédica – Revista del Instituto Nacional de Salud**, 2011, v.31(1):98-99.

Oteo JA, Portillo A. Tick-borne rickettsioses in Europe. **Ticks Tick Borne Dis.** 2012 Dec;3(5-6):271-8. doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.10.035. Epub 2012 Nov 21.

Phillip 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 121:1961-1968.

Plank SJ, Teixeira RS, Milanesi ML. Febre maculosa em Salvador: descrição de um caso. **Rev Med Bahia** 1979 25: 330-333.

Quesada M, Sanfeliu L, Cardenosa 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.

Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **J Bacteriol.** 1991 Mar;173(5):1576-89.

Renvoisé A, Rolain JM, Socolovschi C, Raoult D. Widespread use of real-time PCR for rickettsial diagnosis. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 2012 Feb;64(1):126-9. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00899.x. Epub 2011 Dec.

Richards AL. Worldwide detection and identification of new and old rickettsiae and rickettsial diseases. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012 Feb;64(1):107-10. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00875.x. Review.

Santos, F. C. P.; Nascimento, E. M. M.; Katz, G.; Angerami, R. N.; Colombo, S.; Silva, M. V. APLICAÇÕES DOS MÉTODOS MOLECULARES NO DIAGNÓSTICO DA FEBRE MACULOSA BRASILEIRA. In: XLVII Congresso da Sociedade Brasileira, 2011, Natal. Resumo dos Trabalhos Científicos, 2011.

Sexton DJ, Muniz M, Corey GR, Breitschwerdt EB, Hegarty B, Dumler S, Walker D H, Peçanha PM, Dietzer R. 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: 222-226.

Shipley, GL. Real-Time Quantitative PCR: Theory and Practice DOI:10.1002/3527600906.mcb.200500012 ISBN: 9783527600908 In book: Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine. Published Online: 15 SEP 2006 Copyright © 2006 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA The University of Texas Health Science Center, Houston, TX.

Shu B, Wu KH, Emery S, Villanueva J, Johnson R, Guthrie E, Berman L, Warnes C, Barnes N, Klimov A, Lindstrom S. Design and performance of the CDC real-time reverse transcriptase PCR swine flu panel for detection of 2009 A (H1N1) pandemic influenza virus. **J Clin Microbiol.** 2011 Jul;49(7):2614-9. doi: 10.1128/JCM.02636-10. Epub 2011 May 18.



- Silva LJ, Angerami RN, Nascimento EMM. Doenças causadas por Rickettsias. In: Veronesi R., Focaccia R. **Tratado de Infectologia**, 4ª edição Revista e Atualizada , Vol 1 ,São Paulo:Atheneu, 2010, 789-805.
- Silva N, Eremeeva ME, Rozental T, Ribeiro GS, Paddock CD, Ramos EA, Favacho AR, Reis MG, Dasch GA, de Lemos ER, Ko AI. Eschar-associated spotted fever rickettsiosis, Bahia, Brazil. **Emerg Infect Dis.** 2011 Feb;17(2):275-8. doi: 10.3201/eid1702.100859
- Souza CE, Moraes-Filho J, Ogrzewalska M, Uchoa FC, Horta MC, Souza SS, Borba RC, Labruna MB. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Vet. Parasitol.** 2009 Apr 6;161(1-2):116-21. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.12.010. Epub 2008 Dec 13.
- Spolidorio MG, Labruna MB, Machado RZ, Moraes-Filho J, Zago AM, Donatele DM, Pinheiro SR, Silveira I, Caliari KM, Yoshinari NH. Survey for tick-borne zoonoses in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. **Am J Trop Med Hyg.** 2010 Jul;83(1):201-6. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0595.
- Szabó MP, Pinter A, Labruna MB. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Front Cell Infect Microbiol.** 2013 Jul 12;3:27. doi: 10.3389/fcimb.2013.00027. eCollection 2013. Review.
- Tamakuma K, Mizutani Y, Ito M, Shiogama K, Inada K, Miyamoto K, Utsunomiya H, Mahara F, Tsutsumi Y. Histopathological diagnosis of Japanese spotted fever using formalin-fixed, paraffin-embedded skin biopsy specimens: usefulness of immunohistochemistry and real-time PCR analysis. **Clin Microbiol Infect.** 2012 Mar;18(3):260-7. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03569.x. Epub 2011 Jun 10.

Tzianabos T, Anderson BE, McDade JE Detection of Rickettsia rickettsii DNA in clinical specimens by using polymerase chain reaction technology. **J Clin Microbiol.** 1989 Dec;27(12):2866-8.

Uchiyama T, Kishi M, Ogawa M. Restriction of the growth of a nonpathogenic spotted fever group rickettsia. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 2012a Feb;64(1):42-7. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00879.x.

Uchiyama T. Tropism and pathogenicity of rickettsiae. **Front Microbiol.** 2012b;3:230. doi: 10.3389/fmicb.2012.00230. Epub 2012 Jun 25.

Walker D H. Tick transmitted infectious diseases in the United States. **Annu Rev Public Health**1998 19:..237-269.

Walker DH, Ismail N. Emerging and re-emerging rickettsioses: endothelial cell infection and early disease events. **Nat Rev Microbiol.** 2008 May;6(5):375-86. doi: 10.1038/nrmicro1866. Review.

Wood H, Artsob H. Spotted Fever group rickettsiae: a brief review and a canadian perspective. **Zoonoses Public Health.** 2012 Sep;59 Suppl 2:65-79. doi: 10.1111/j.1863-2378.2012.01472.x.

**Anexo I - Aprovação do projeto no CTC e CEP-IAL**



**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ  
CONSELHO TÉCNICO CIENTÍFICO – CTC/IAL**



São Paulo, 24 de maio de 2012.

Ilma. Sra.  
Dra. Akemy Suzuki  
Diretora Técnica do Núcleo de Doenças de Transmissão Vetorial  
Centro de Virologia

Prezada Diretora,

Venho por meio deste, informar que o CTC registrou a participação da funcionária Fabiana Cristina Pereira dos Santos, pesquisadora científica do NDTV, em Programa de Pós-graduação em nível de Doutorado. O projeto de tese foi aprovado pelo CEP-IAL e registrado no CTC N<sup>o</sup> 01D/2011.

Atenciosamente,

Dra. Maria do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky  
Presidente do Comitê Técnico Científico do IAL

1<sup>a</sup> Via: Diretor do Núcleo  
2<sup>a</sup> Via: Funcionário  
3<sup>a</sup> Via: CTC



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS  
**INSTITUTO ADOLFO LUTZ**  
Comitê de Ética em Pesquisa - CEPIAL  
Av. Dr. Arnaldo, 355 – Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902  
Fone: 3068-2859 e-mail: [cepial@ial.sp.gov.br](mailto:cepial@ial.sp.gov.br)



São Paulo, 22 de julho de 2011.

Protocolo: **035/2011**

Projeto de Pesquisa: “Aplicações da PCR em Tempo Real no diagnóstico laboratorial de Febre Maculosa Brasileira”.

Pesquisador Responsável: Fabiana Cristina Pereira dos Santos

Instituição: Instituto Adolfo Lutz

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz - CEPIAL analisou e deliberou em reunião ordinária de 21 de julho de 2011, de acordo com a Resolução CNS nº 196 de 10 de outubro de 1996 e suas resoluções complementares, o projeto na categoria **APROVADO**.

Em conformidade com o item IX. 2 da Resolução CNS nº 196/96 - cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados. Os relatórios parciais deverão ser encaminhados ao CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Luz Marina Trujillo

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL

1ª via – coordenador  
2ª via - CEPIAL  
LMT/dvmp

**Anexo II-** Trabalhos Publicados

dos Santos FC, do Nascimento EM, Katz G, Angerami RN, Colombo S, de Souza ER, Labruna MB, da Silva MV. Brazilian spotted fever: real-time PCR for diagnosis of fatal cases. **Ticks Tick Borne Dis.** 2012 Dec;3(5-6):312-4. doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.10.027. Epub 2012 Nov 16.

**Anexo III.** Distribuição dos casos confirmados de Febre Maculosa, segundo município de infecção no Estado de São Paulo, 1998 - 2012\*.

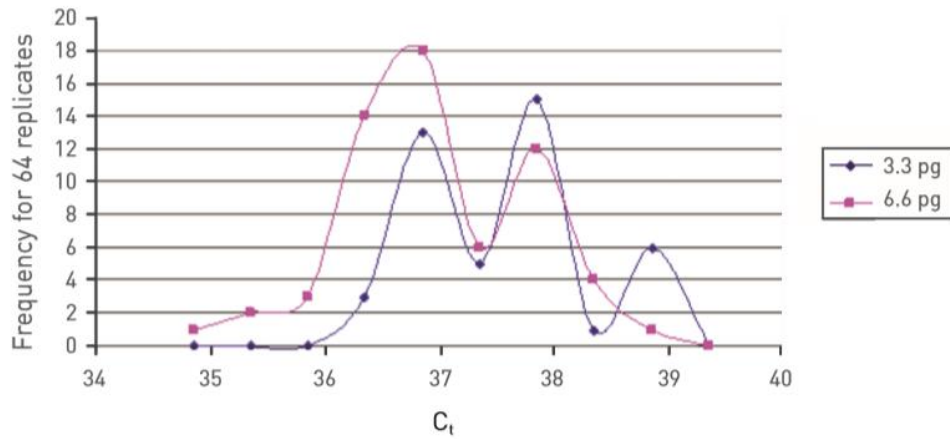
DRS	GVE	Município provável de infecção	Município provável de infecção												Total		
			1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009		2010	2011
7	XVII	Aguas de Lindóia						1									1
7	XVII	Americana							2								2
7	XVII	Amparo			5					2	1					1	8
10	XX	Araras											2	1	1		9
7	XVII	Artur Nogueira									3		1			4	8
7	XVII	Atibaia								1	2						3
		Assis												2			2
12	XXIII	Cajati										1					1
7	XVII	Campinas			2	5	3	3	3	4	10	7	4	14	11	8	78
9	XIII	Candido Mota										2		1		1	4
9	XIII	Canitar										1					1
10	XX	Capivari												1			1
17	XXVIII	Caraguatatuba								1				1		3	5
9	XIII	Chavantes											2				2
7	XVII	Cosmópolis						1		1		1	1	1	1	3	10
1	VII	Diadema	1					2	1	3	2		2			1	13
14	XXVI	Estiva Gerbi									1				1		2
9	XIX	Garça												1			1
4	XXV	Guarujá								1							1
1	VIII	Guarulhos												1		1	2
7	XVII	Holambra									1			2			3
7	XVII	Hortolandia											1				1
9	XIII	Ibirarema											2				2
7	XVII	Indaiatuba										1					1
10	XX	Ipeuna						1									1
15	XXIX	Irapuã								1							1
14	XXVI	Itapira								1							1
12	XXIII	Itariri												1			1
7	XVII	Itatiba												1			1
16	XXXII	Itu						1		1				1		1	5
7	XVII	Jaguariuna	2	2	3			4	2	2	3		2	2	1	1	24
7	XVII	Jundiai											1	1		1	3
12	XXIII	Juquia												1		1	2
10	XX	Limeira			1											2	3
7	XVII	Lindoia					1				2						3
7	XVII	Louveira										1		1		1	4
1	XIX	Mairiporã														1	1
6	XVI	Manduri													1		1
9	XIII	Maracai													1		1
9	XIX	Marília								1							1
1	VII	Mauá							3	1							4
14	XXVI	Mococa								1	1						3
1	VIII	Mogi das Cruzes	5					2		1	1			1			10
14	XXVI	Mogi-Guaçu												1			1
7	XVII	Monte Alegre do Sul							2	1				1			4
7	XVII	Monte Mor			1					1							2
7	XVII	Morungaba							1								1
7	XVII	Nova Odessa													3	1	4
9	XIX	Ocaucu												1			1
9	XIX	Oriente						1									1
9	XIII	Ourinhos									1						1
9	XIII	Paraguaçu											1				1
7	XVII	Paulínea				5					1				2		12
7	XVII	Pedreira	3		3	2	3	7	2	1	2		1	1			25
9	XIII	Pedrinhas Paulista											1				1
12	XXIII	Pedro de Toledo												1		1	2
4	XXV	Peruibe												3			3
10	XX	Piracicaba					1	1	5	12	1	1	5	2	1	3	41
6	XVI	Piraju											1				2
9	XIII	Platina											1				1
		Porto Feliz														2	2
4	XXV	Praia Grande								1							1
17	XXXIII	Queluz								3							3
1	VII	Ribeirão Pires						1								2	3
13	XXIV	Ribeirão Preto							1							2	3

Continua na próxima página

16	XXXII	Salto					3		3		1					7		
7	XVII	Santa Barbara d'Oeste					1	1				1	1	2	2	8		
13	XII	Santa Rita do Passa Quatro											1			1		
1	VII	Santo André		1				2	2		2	3	1		8	19		
7	XVII	Santo Antonio da Posse	2								1					3		
1	VII	São Bernardo do Campo			1	1	1	3		5	4	1	4	4		24		
1	I	São Paulo			1		1	3			2	1	3	2	1	15		
10	XX	São Pedro						1								1		
16	XXXII	São Roque										1				1		
17	XXVIII	São Sebastião												2		2		
7	XVII	Sumaré		1							1	1		1		4		
9	XIII	Tarumã									1				1	2		
16	XXXII	Tatui										1				1		
16	XXXI	Tietê										1			1	2		
17	XXVIII	Ubatuba							1	1	1	3		1		7		
7	XVII	Valinhos				3	2	3	3	3	3	1	1	14	5	38		
7	XVII	Vinhedo					7	1		1	1	2	1	4	1	18		
		Outros												5	6	12		
		TOTAL	13	2	16	14	9	29	37	53	37	34	43	57	37	70	68	521

Fonte: [http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/fmaculosa\\_dados.html](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/fmaculosa_dados.html). SINANNET/ZOONOSES/CVE/SP. Dados atualizados em Fevereiro de 2013. GVE= Grupo de Vigilância Epidemiológica, GVE I – Capital, GVE VII – Santo André, GVE VIII – Mogi das Cruzes, GVE IX – Franco da Rocha, GVE X – Osasco, GVE XI – Araçatuba, GVE XII – Araraquara, GVE XIII – Assis, GVE XIV – Barretos, GVE XV – Bauru, GVE XVI – Botucatu, GVE XVII – Campinas, GVE XVIII – Franca, GVE XIX – Marília, GVE XX – Piracicaba, GVE XXI – Presidente Prudente, GVE XXII – Presidente Venceslau, GVE XXIII – Registro, GVE XXIV – Ribeirão Preto, GVE XXV – Santos, GVE XXVI – São João da Boa Vista, GVE XXVII – São José dos Campos, GVE XXVIII – Caraguatatuba, GVE XXIX – São José do Rio Preto, GVE XXX – Jales, GVE XXXI – Sorocaba, GVE XXXII – Itapeva, GVE XXXIII – Taubaté DRS= Departamento Regional de Saúde. DRS I - Grande São Paulo, DRS II – Araçatuba, DRS III – Araraquara, DRS IV - Baixada Santista, DRS V – Barretos, DRS VI – Bauru, DRS VII – Campinas, DRS VIII – Franca, DRS IX – Marília, DRS X – Piracicaba, DRS XI - Presidente Prudente, DRS XII – Registro, DRS XIII - Ribeirão Preto, DRS XIV - São João da Boa Vista, DRS XV - São José do Rio Preto, DRS XVI – Sorocaba, DRS XVII – Taubaté.

**Anexo VI-** Gráfico da distribuição de Poisson para detecção de baixo número de cópias na qPCR para 64 replicatas.



Distribuição de Poisson para baixo número de cópias no qPCR. A curva azul representa a distribuição de Poisson para detecção em 64 replicatas com 1 cópia de DNA (3,3 pg de DNA). A curva rosa representa a distribuição de Poisson para detecção em 64 replicatas com 2 cópias de DNA (6,6 pg de DNA). **Application Note, ABI by LifeTechnologies, 2011.**