

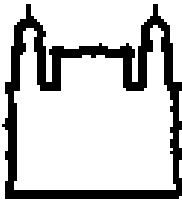
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Mestrado em Medicina Tropical

**Estudo Molecular da Febre Maculosa Brasileira no Diagnóstico Diferencial com
Dengue no Estado do Rio de Janeiro Durante o Período de 2010 a 2011**

Kerla Joeline Lima Monteiro

RIO DE JANEIRO

2014



Instituto Oswaldo Cruz

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Medicina Tropical

**Estudo Molecular da Febre Maculosa Brasileira no Diagnóstico Diferencial com
Dengue no Estado do Rio de Janeiro Durante o Período de 2010 a 2011**

Kerla Joeline Lima Monteiro

**Dissertação apresentada ao Instituto
Oswaldo Cruz como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Medicina Tropical, área de concentração:
Diagnóstico, Epidemiologia e Controle de
Doenças Infecciosas e Parasitárias.**

Orientadora: Dra Elba Regina Sampaio de Lemos

RIO DE JANEIRO

2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

M775 Monteiro, Kerla Joeline Lima

Estudo molecular da febre maculosa brasileira no diagnóstico diferencial com dengue no estado do Rio de Janeiro durante o período de 2010 a 2011 / Kerla Joeline Lima Monteiro. – Rio de Janeiro, 2014.

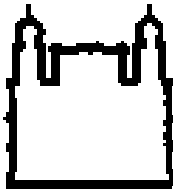
xxii, 97 f.: il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2014.

Bibliografia: f. 86-94

1. Diagnóstico diferencial. 2. Febre maculosa brasileira. 3. *Rickettsii*. 4. Dengue. 5. PCR. 6. Estado do Rio de Janeiro. I. Título.

CDD 614.5263



Instituto Oswaldo Cruz

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Medicina Tropical

**Estudo Molecular da Febre Maculosa Brasileira no Diagnóstico Diferencial com
Dengue no Estado do Rio de Janeiro Durante o Período de 2010 a 2011**

ORIENTADORA: Dra. Elba Regina Sampaio de Lemos

Aprovada em: 20/03/2014

Banca Examinadora

Dra. Lia Laura Lewis – (Presidente) IOC/FIOCRUZ

Dra. Ana Maria Bispo de Filippis – (Membro) IOC/FIOCRUZ

Dra. Rosany Bochner - (Membro) ICICT/FIOCRUZ

Dr. Filipe Anibal - (Revisor e Suplente) IOC/FIOCRUZ

Dra. Tatiana Rozental – (Suplente) IOC/FIOCRUZ

RIO DE JANEIRO

2014

iv

“O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho.”

Abraham Lincoln

Dedico esta tese a Antônio (pai), Jacira (mãe) e Francisca (tia) por estarem ao meu lado sempre, desde o início.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir, a cada dia, saber que ele foi, é e sempre será fiel a sua palavra.

À minha orientadora Dra. Elba Lemos, pelo acolhimento, paciência e carinho. Professora querida, muito, muito obrigada por contribuir ativamente para que esse dia chegasse. Dra. Elba é gente que o Brasil precisa!

À equipe do LHR: Michelle Ferreira, Endiá Barros, Dani Tupy, Angélica Mares-Guia, Jorlan Fernandes, Liana Strecht, Cristiane Silva, Tatiana Rozental, Alexsandra Favacho, Alexandro Guterres, Luciana Bassan, Renata Oliveira, Adonai Junior e Raphael Gomes. Não poderia deixar de citar o nome de todos vocês porque cada um foi importante nesses últimos dois anos e facilitaram o andamento da tese. Um agradecimento mais que especial para duas pessoas: Michelle Ferreira, pela companhia insubstituível. Michelle, você é amiga pra uma vida inteira e Endiá Barros, por estar lá, sempre, pronta para ajudar. Endiá, você é uma menina de ouro!

Gostaria também de reforçar meus agradecimentos a Jorlan e Liana, meus companheiros de mestrado. Nós vencemos, chegamos ao final dessa etapa!

Dois agradecimentos especiais: à Dra. Rosany Bochner por disponibilizar sua ajuda para fazer a parte estatística do trabalho e à Tatiana Rozental por auxiliar na revisão da tese após a defesa. Professora Rosany, muito obrigada pela paciência e boa vontade no momento em que eu tanto precisei! Tati, obrigada por dedicar parte do seu tempo comigo, muito obrigada!!!!

A todos os membros da banca, revisor e suplentes por terem aceitado o convite.

À coordenação do curso de pós-graduação em Medicina tropical do IOC/Fiocruz pela oportunidade em realizar o mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por viabilizar o suporte financeiro através da bolsa de estudo.

Aos professores do curso de pós-graduação pelo esforço em conduzir as aulas de forma atual de uma maneira que pudéssemos interagir.

À equipe do LACEN/RJ, principalmente à Shirlei Aguiar e Carlos Fernandes pela colaboração durante a execução do projeto.

Aos meus pais (Antônio e Jacira) e minha irmã (Késsia) que torcem incansavelmente pelo meu sucesso. Ao meu avô (José) pelo espírito de luta e minha tia Francisca (Maninha) por dar de graça um amor de mãe. Vovô, eu ainda lembro quando o senhor me ensinava a ler! Maninha, obrigada pelas palavras certas, no momento certo!

A Diego por esses oito anos de muito amor, companheirismo, empatia e carinho. Sou imensamente grata a Deus por você estar ao meu lado!

Meus sinceros agradecimentos ao professor Rozeverter Moreno e professora Zenaide pela amizade que cultivam até hoje com minha família, por abrirem meus caminhos na vida acadêmica e me apresentarem à Fiocruz.

À Antenor Andrade e Yvone Andrade pelo carinhoso acolhimento no Rio de Janeiro!

À minha amiga Márcia Andrade por estar ao meu lado em todos os momentos, tenham sido eles felizes ou difíceis e por me deixar fazer parte da sua família em muitos e muitos momentos. Histórias para contar aos meus netos sobre nós não vão faltar.

À Tatiana Kugelmeier e família pela amizade, paciência nos momentos que mais precisei. Tati, não tenho palavras para lhe agradecer!

Com carinho, agradeço a Hattie Cobb e família pelos conselhos e pela convivência agradável. Hattie, muitos momentos que precisava ter coragem você estava lá para dar força!

Aos meus companheiros de muitos anos: Alessandra Teixeira (Alê), Samanta Xavier (Sam), Fabiana Rocha (Biazinha), Daniele Bilac (Dani), Carolina (Carol), Valquíria Meneses (Val), Grégor Asevedo (Gregório), Renata (Renatinha), Valdirene Lima (Branca), Carlos Alberto (Carlos), Marcus Lima (Marcão), Fernanda Alves (Fernandinha). Foi difícil deixar a convivência diária com todos vocês, mas o bom de tudo é que quando nos encontramos tudo é só alegria! Um agradecimento mais que especial à Sam pela ajuda até o último momento dessa jornada.

Um carinhoso agradecimento a minha doce e amiga Vanessinha Neiva pela ajuda e companheirismo durante as aulas. Minha querida, você é tão especial, uma pessoa tão íntegra. Já disse a você que lhe admiro muito!

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES E SÍMBOLOS.....	xiii
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	xvii
LISTA DE FIGURAS.....	xviii
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT.....	xxii
1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1 Considerações Gerais.....	23
1.1.1 Diagnóstico Diferencial entre as Doenças Febris Agudas.....	23
1.2 Dengue.....	26
1.3 Rickettsioses.....	32
1.3.1 Etiologia das Bactérias do Gênero <i>Rickettsia</i>	33
1.3.2 Distribuição Geográfica das Rickettsioses do Grupo da Febre Maculosa....	35
1.3.3 Febre Maculosa Brasileira.....	36
1.3.4 Dinâmica de Transmissão.....	39
1.3.5 Patogenia.....	41
1.3.6 Manifestações Clínicas.....	42
1.3.7 Diagnóstico Laboratorial.....	44

1.3.8 Diagnóstico Diferencial.....	47
1.3.9 Tratamento.....	48
2. JUSTIFICATIVA.....	59
3. OBJETIVOS.....	50
3.1 Objetivo Geral.....	50
3.2 Objetivos Específicos.....	50
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1 Desenho e Local do Estudo.....	51
4.2 Análise das Fichas Epidemiológicas e dos Critérios de Inclusão.....	51
4.3 Descrição das Variáveis Estudadas.....	52
4.4 Análise Laboratorial das Amostras.....	53
4.4.1 Extração de DNA.....	53
4.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	54
4.4.2.1 Primer CS406-427F1/1270-1291R1; OmpA4940-4961F1/5690-5710R1.....	54
4.4.3 <i>Nested</i> PCR.....	55
4.4.3.1 Primer CS 494-515F2/1045-1066 R2; OmpA4986-4961F2/5418-5442R2.....	55
4.4.4 Eletroforese em Gel de Agarose.....	57
4.4.5 Sequenciamento.....	57
4.4.6 Análise das Sequências Genômicas.....	57

4.5 Análise Estatística.....	58
5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	58
6. RESULTADOS.....	59
6.1 Características Clínicas e Epidemiológicas.....	59
6.1.1 Perfil da população total por faixa etária e sexo para os anos de 2010 e 2011.....	62
6.2 População do Estudo após Aplicação dos Critérios de Inclusão.....	66
6.2.1 Perfil da população de estudo por faixa etária e sexo de janeiro de 2010 a junho de 2011.....	69
6.3 Análise dos Casos Fatais.....	71
6.4 Resultado da Análise Molecular (PCR) para Febre Maculosa Brasileira.	73
7. DISCUSSÃO.....	75
8. CONCLUSÕES.....	83
9. PERSPECTIVAS.....	84
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
11. ANEXOS.....	94
11.1 Anexo 1.....	95
11.2 Anexo 2.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
AM	Amazonas
ALT	Aspartato Aminotransferase
AST	Aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
BA	Bahia
CDC	Center of Diseases Control and Prevention (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)
CE	Ceará
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
DC	Dengue Clássico
DCC	Dengue com Complicação
DCSA	Dengue com Sinais de Alarme
DENV	Vírus do Dengue
DENV-1	Vírus Dengue Sorotipo 1
DENV-2	Vírus Dengue Sorotipo 2

DENV-3	Vírus Dengue Sorotipo 3
DENV-4	Vírus Dengue Sorotipo 4
DG	Dengue Grave
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> (Ensaio Imunoenzimático)
ES	Espírito Santo
EUA	Estados Unidos da América
FHD	Febre Hemorrágica do Dengue
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FMB	Febre Maculosa Brasileira
FMMR	Febre Maculosa das Montanhas Rochosas
G6PD	Glicose 6-Fosfato Desidrogenase
GAL	Gerenciador de Ambiente Laboratorial
GFM	Grupo da Febre Maculosa
GO	Goiás
IFN- γ	Interferon-Gama
IgG	Imunoglobulina da Classe G
IgM	Imunoglobulina da Classe M
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
KDa	Quilodaltons

Kg	Kilograma
LACEN	Laboratório Central Noel Nutels
LHR	Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses
LIRAA	Levantamento Rápido de Índices para <i>Aedes aegypti</i>
MG	Minas Gerais
Mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
Mm	Milimolar
MS	Ministério da Saúde
MS	Mato Grosso do Sul
MT	Mato Grosso
NS1	Proteína Não-Estrutural 1
°C	Grau Celsius
Omp	<i>Outer Membrane Protein</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
pMol	Picomol
PR	Paraná
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta

RJ	Rio de Janeiro
Rpm	Rotação por Minuto
RS	Rio Grande do Sul
RT-PCR	Transcrição Reversa Seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase
S	Segundo
SC	Santa Catarina
SCD	Síndrome do Choque por Dengue
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SP	São Paulo
SUIPA	Sociedade União Internacional Protetora dos Animais
TBE	Tampão de Eletroforese Tris-Borato-EDTA
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-Alfa
TO	Tocantins
USA	United States of America (Estados Unidos da América)
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)
μm	Micrômetro

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Pág.
Quadro 1.1: Espécies de proteobactérias do gênero <i>Rickettsia</i> segundo o grupo e doença humana.....	35
Quadro 4.1: Oligonucleotídeos (<i>primers</i>) utilizados para detecção das <i>Rickettsia</i> sp. em amostras de casos suspeitos de dengue, mas soronegativos no estado do Rio de Janeiro durante o período de janeiro de 2010 a junho de 2011.....	57
Quadro 4.2: Oligonucleotídeos (<i>primers</i>) utilizados para detecção da espécie <i>R. rickettsii</i> em amostras de casos suspeitos de dengue, mas soronegativos, no estado do Rio de Janeiro, durante o período de janeiro de 2010 a junho de 2011.....	57
Tabela 6.1: Perfil dos pacientes suspeitos de dengue sorologicamente negativos, no estado do Rio de Janeiro, por faixa etária e sexo distribuído de janeiro de 2010 a junho de 2011....	64
Tabela 6.2: Perfil dos pacientes suspeitos de dengue sorologicamente negativos, após atendimento aos critérios de inclusão, no estado do Rio de Janeiro, por faixa etária e sexo distribuído de janeiro de 2010 a junho de 2011.....	71
Tabela 6.3: Total de óbitos em casos suspeitos de dengue, sorológica e molecularmente negativos, no estado do Rio de Janeiro, durante o período de janeiro de 2010 a junho de 2011.....	74

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1: Distribuição global de países ou áreas de risco de transmissão de dengue-2011.....	27
Figura 1.2: Média anual de casos de dengue e dengue grave reportado pela OMS e de países com casos de dengue, 1955–2011.....	28
Figura 1.3: Número de casos notificados no Brasil, 1986-2013.....	30
Figura 1.4: Esquema com as técnicas laboratoriais utilizadas no diagnóstico da dengue segundo a fase de doença.....	33
Figura 1.5: Esquema de classificação taxonômica das proteobactérias com ênfase nas rickettsias.....	34
Figura 1.6: Distribuição geográfica de rickettsias patogênicas do grupo da febre maculosa.....	36
Figura 1.7: Estados com casos confirmados de Febre Maculosa Brasileira no Brasil.....	38
Figura 1.8: Casos confirmados de febre maculosa brasileira por região entre os anos de janeiro de 2001-a junho de 2013.....	39
Figura 1. 9: O ciclo de vida de rickettsias transmitidas por carrapatos.....	40
Figura 1.10: Exantema em paciente do Rio de Janeiro com Febre Maculosa brasileira causada por <i>Rickettsia rickettsii</i>	44
Figura 1.11: Esquema com as técnicas laboratoriais utilizadas no diagnóstico da febre maculosa brasileira segundo a fase de doença.....	48
Figura 6.1: Fluxograma dos resultados das etapas metodológicas utilizadas no estudo.....	61

Figura 6.2: Quantitativo de amostras de casos suspeitos de dengue, sorologicamente negativos (IgM captura), segundo os municípios do estado do Rio de Janeiro, durante o ano de 2010.....	62
Figura 6.3: Quantitativo de amostras de casos suspeitos de dengue, sorologicamente negativos (IgM captura), segundo os municípios do estado do Rio de Janeiro, de janeiro a junho de 2011.....	63
Figura 6.4: Distribuição dos casos suspeitos de dengue, sorologicamente negativos, segundo gênero e faixa etária, no estado do Rio de Janeiro (janeiro de 2010 a junho de 2011).....	65
Figura 6.5: Frequência das manifestações clínicas dos casos suspeitos de dengue, sorologicamente negativos, no estado do Rio de Janeiro (janeiro de 2010 a junho de 2011).....	66
Figura 6.6: Distribuição mensal de casos suspeitos de dengue, sorologicamente negativos, no estado do Rio de Janeiro (janeiro de 2010 a junho de 2011).....	67
Figura 6.7: Municípios com casos confirmados de febre maculosa brasileira no estado do Rio de Janeiro durante o período de 2008-2012.....	68
Figura 6.8: Quantitativo de casos suspeitos de dengue, sorologicamente negativos, após critério de inclusão, segundo os municípios no estado do Rio de Janeiro no ano de 2010.....	69
Figura 6.9: Quantitativo de casos suspeitos de dengue, sorologicamente negativos, após critério de inclusão, segundo os municípios no estado do Rio de Janeiro, no período de janeiro a junho de 2011.....	70
Figura 6.10: Distribuição mensal de casos suspeitos de dengue, sorologicamente negativos, após atendimento aos critérios de inclusão, no estado do Rio de Janeiro (janeiro de 2010 a junho de 2011).....	72
Figura 6.11: Eletroforese em gel de agarose de <i>Rickettsia</i> sp. e <i>R. rickettsii</i> , produto da reação em cadeia da polimerase amplificado a partir de DNA total de amostras do paciente 05 que	

evoluiu para óbito no sexto dia de doença febril aguda no estado do Rio de Janeiro (2011)..... 75

Figura 7.1: Proporção de óbitos (%) por causa não definida segundo ano do óbito e região, Brasil 1979 a 2004..... 82

RESUMO

Doenças febris agudas são comuns e frequentemente associadas com agentes infecciosos em países tropicais como o Brasil. Com manifestações clínicas inespecíficas de difícil diferenciação com uma série de doenças endêmicas como dengue, leptospirose e outras doenças fatais, a febre maculosa brasileira (FMB) raramente tem sido considerada no diagnóstico, fato que, com o conseqüente retardo no tratamento antimicrobiano específico, tem determinado a elevada letalidade frequentemente observada em nosso país. A dengue é uma das doenças infecciosas mais importantes e frequentes no Brasil, onde epidemias são relatadas periodicamente no estado do Rio de Janeiro. Durante surtos de dengue, a possibilidade de erros no diagnóstico, devido à semelhança clínica, é uma realidade e a FMB deve ser considerada no diagnóstico diferencial de pacientes com febre, cefaleia e exantema. Neste contexto, considerando a hipótese de que a FMB, uma zoonose negligenciada transmitida por carrapatos, por falta de suspeita clínica, possa não ter sido identificada durante o surto de dengue ocorrido nos anos de 2010-2011, um estudo retrospectivo foi realizado com base em dados secundários e em amostras acondicionadas em laboratório de saúde pública. Amostras de sangue de pacientes com suspeita de dengue, mas que foram descartadas sorologicamente para dengue durante o período de janeiro de 2010 a junho de 2011, no estado do Rio de Janeiro, foram submetidas à amplificação por PCR usando primers rickettsianos específicos para genes *gltA* e *rOmpA*. A partir dos critérios de elegibilidade preconizados, somente 319 amostras, dos 4.343 casos identificados, foram submetidas à pesquisa de FMB. *Rickettsia rickettsii* foi identificada em dois casos fatais no município do Rio de Janeiro e ambos pacientes apresentavam quadro clínico inespecífico sem exantema, cujo óbito ocorreu antes do sétimo dia de doença. Estes resultados comprovam a importância de incluir a FMB no diagnóstico diferencial da dengue, especialmente em regiões onde têm sido relatados casos desta zoonose, cuja letalidade é elevada, na ausência de tratamento específico precoce.

ABSTRACT

Acute febrile diseases are common and often associated with infectious agents in tropical countries such as Brazil. With nonspecific clinical manifestations and hard to differentiate with a number of endemic diseases such as dengue, leptospirosis, and other fatal diseases, Brazilian Spotted Fever (BSF) has rarely been considered in the diagnosis, fact that with the consequent delay in the specific antimicrobial treatment, has determined high lethality often observed in our country. Dengue is one of the most important and frequent infectious diseases in Brazil, where epidemics are reported periodically in the State of Rio de Janeiro. During dengue fever outbreaks, the possibility of errors in diagnosis due to clinical similarity, BSF should be considered in the differential diagnosis of patients with fever, headache, and rash. In this context, considering the hypothesis that BSF, a neglected zoonosis transmitted by ticks, for lack of clinical suspicion, may not have been identified during the dengue outbreak occurred in the years 2010-2011, a retrospective study was performed based on secondary data and samples placed in public health laboratory. Blood samples from patients with suspected dengue that were serologically discarded during the period of January 2010 to June 2011 in the state of Rio de Janeiro, were subjected to PCR amplification using specific rickettsial primers for *gltA* and *rOmpA* genes. From the eligibility criteria preconized, only 319 samples of 4,319 cases identified were submitted to BSF research. *Rickettsia rickettsii* was identified in two fatal cases in the city of Rio de Janeiro and both patients had nonspecific clinical picture without rash, whose death occurred before the seventh day of illness. These results demonstrate the importance of including BSF in the differential diagnosis of dengue, specially in regions where cases of this zoonotic disease have been reported, whose lethality is high in the absence of early specific treatment.

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

As doenças febris agudas, frequentemente associadas com agentes infecciosos em países tropicais como o Brasil, são geralmente caracterizadas por manifestações clínicas inespecíficas, cuja identificação etiológica passa ser de grande complexidade diagnóstica, considerando a ocorrência de doenças endêmicas como a dengue, leptospirose, malária, rubéola e influenza, além de doenças que, caracteristicamente, ocorrem como casos isolados ou na forma de pequenos surtos como a febre maculosa brasileira (FMB) e a síndrome pulmonar por hantavírus.

Não obstante a dificuldade no diagnóstico clínico, a confirmação laboratorial, na maioria das vezes, é dificultada, entre outros fatores, pela ausência de testes diagnósticos específicos para diversos agentes infecciosos, insuficiência de insumos assim como pela falta de medidas de sensibilização quanto à importância dos mesmos no diagnóstico diferencial de doenças mais comuns como, por exemplo, a dengue e a leptospirose.

Assim, não raramente, durante períodos de epidemia de uma determinada doença, muitos casos febris agudos são considerados laboratorialmente negativos e permanecem com uma etiologia indefinida. Nesse contexto, outros agravos que também estejam ocorrendo na região acabam não sendo identificados, o que leva, conseqüentemente, na ausência de uma investigação, ao completo desconhecimento no que diz respeito a incidência, letalidade assim como a instituição de medidas de controle e prevenção, sobretudo nas doenças infecciosas que caracteristicamente não determinam um impacto quantitativo na saúde pública.

1.1.1 O Diagnóstico Diferencial entre as Doenças Febris Agudas

Embora relatadas em todo o mundo, principalmente nos países tropicais, as doenças febris agudas se apresentam, geralmente, com etiologia indefinida em decorrência, entre

outros fatores, dos sinais clínicos inespecíficos e da indisponibilidade de testes diagnósticos específicos. Esta indefinição, não raramente, pode determinar o desenvolvimento de doenças com uma maior morbidade e mortalidade, na ausência ou no retardo do tratamento específico. O diagnóstico diferencial de doença febril passa a ser muito extenso e complexo com a inclusão de uma diversidade de agentes etiológicos, tanto infecciosos quanto não infecciosos. No entanto, embora existam muitas causas importantes, a presença de febre com exantema pode representar uma importante emergência infecciosa que pode ter grande implicação na saúde pública. Neste contexto, faz-se necessária a realização de um diagnóstico oportuno e específico, levando em consideração, entre outros fatores, o número de casos (epidemias, surtos), a faixa etária predominante atingida, a história de viagem e o status vacinal. Uma história completa é extremamente importante para auxiliar no diagnóstico diferencial. Exposições ocupacionais, contato com animais ou pessoas doentes, picadas de insetos, realização de atividades específicas com exposição a patógenos específicos, relato de viagens, o período do ano podem auxiliar, levando em consideração também a ocorrência de um amplo espectro das manifestações clínicas, desde uma doença febril branda a uma doença grave e fatal.

A maioria das doenças infecciosas febris apresenta manifestações clínicas bastante semelhantes e o diagnóstico laboratorial deve ser indicado não somente para confirmação etiológica, mas também para a identificação da circulação de outros agentes infecciosos, cuja incidência ainda não é completamente conhecida, considerando as variações sazonais e regionais. No entanto, apesar da necessidade de um suporte laboratorial para o esclarecimento etiológico, ao revisar a literatura científica, é possível verificar a escassez de estudos sobre a etiologia de doenças infecciosas febris, em especial as exantemáticas, com a maioria destes estudos restritos aos países do hemisfério norte (Davidkin et al. 1998, de Moraes et al. 2011, Oliveira et al. 2001, Papania et al. 1994, Ramsay et al. 2002, Shirley et al. 1987)

Restringindo o exercício do diagnóstico diferencial da dengue, a mais importante arbovirose no Mundo e no Brasil, com outras doenças infecciosas, estudos desenvolvidos confirmam a dificuldade diagnóstica e a importância da vigilância sindrômica com um

adequado suporte laboratorial. Entre estes estudos, podemos citar o de Zavala-Velazquez e colaboradores que, em 1996, identificaram, no México, um surto de febre maculosa em pacientes cujo diagnóstico clínico-epidemiológico inicial foi de dengue. Em 2012, ainda no México, diante da identificação de 48% dos pacientes com dengue, 6,4% com leptospirose, 11,7% com ambas as infecções e 33,9% com nenhum dos agentes testados em casos suspeitos de dengue, Dircio Montes Sergio e colaboradores propuseram a inclusão do diagnóstico da leptospirose e de outros agentes, como a influenza, rickettsias, brucela, mediante a suspeita inicial de dengue, já que os resultados mostraram que a prevalência da leptospirose em indivíduos sob suspeita de dengue é alta e que surtos sobrepostos podem coexistir (Dircio Montes Sergio et al. 2012)

Na bacia amazônica do Equador, Manock e colaboradores, em 2009, demonstraram, em pacientes com quadro febril, a co-circulação, além de arboviroses de agentes causadores da malária, leptospirose e rickettsioses, reforçando a necessidade do diagnóstico laboratorial.

Na Índia, mas especificamente na região sul, em 2010, Chrispal e colaboradores confirmaram a presença de diferentes agentes infecciosos, onde as rickettsioses e a dengue, foram, respectivamente, as 4^a e 6^a causas de doenças febris agudas indiferenciadas, associadas com exantema, mais identificadas.

No Brasil, entre alguns estudos realizados sobre diagnóstico diferencial, Silva e Evangelista (2010), a partir de amostras de soro de casos suspeitos de dengue com teste sorológico não reagente no Distrito Federal, detectaram a presença de anticorpos anti-leptospira (14,1%) e anti-rubéola (4,0%), reforçando a necessidade do exercício do diagnóstico diferencial.

Ainda no Brasil, com o controle do sarampo e da rubéola, a etiologia das doenças exantemáticas febris tem apresentado uma profunda modificação, com a identificação de outros agentes, em especial dos agentes virais da dengue, em decorrência das contínuas e frequentes epidemias, além do parvovírus; herpes vírus humano tipo 6 (exantema súbito) e

do herpes vírus humano tipo 7, estes três últimos mais frequentemente descritos em crianças (de Moraes et al. 2011, Oliveira et al. 2001).

Neste mesmo cenário é imprescindível incluir as doenças febris adquiridas durante as viagens internacionais que aumentaram 50% em relação à década passada, com mais de um bilhão de turistas internacionais em diferentes lugares do mundo. Destinos turísticos, cada vez mais diversificados, especialmente a países com economia em desenvolvimento, têm aumentado desordenadamente e o número de viajantes saltou de 31% em 1990 para 41% em 2010 com o continente asiático liderando o *ranking* do número de casos relatados de doenças entre viajantes (Leder et al. 2013).

1.2 DENGUE

A dengue é uma doença febril aguda causada pelos vírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* sendo relatada em todo o mundo (Westaway et al. 1985). O vírus da dengue (DENV) possui quatro sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) antigenicamente distintos transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes* (Sabin 1952, Hammon et al. 1960, Westaway et al. 1985, Chen & Vasilakis 2011). O relato de um quinto sorotipo, detectado em casos humanos e associado a casos graves foi anunciado por Vasilakis, em 2013, que em um estudo atual, isolou e caracterizou esse novo e emergente sorotipo de transmissão silvestre em Sarawak, Malásia. O surgimento e a disseminação dos quatro sorotipos no continente africano e americano assim como Sudeste da Ásia e Mediterrâneo Oriental representam uma pandemia (WHO 2013) (Figura 1.1).

Considerada a arbovirose mais importante na atualidade, em 2012, esta virose ocorreu em mais de 125 países, atingindo 2,5 bilhões de pessoas em regiões tropicais e subtropicais, com 120 milhões de casos em viajantes que retornaram de regiões endêmicas (WHO 2009 & 2013, Bäck & Lundkvist 2013, dos Santos et al. 2011).



Figura 1.1: Distribuição global de países ou áreas de risco de transmissão de dengue-2011 (Adaptado da WHO 2013).

Entre os anos de 1955-2011 houve um aumento constante no número de casos de dengue e dengue grave (Figura 1.2) (WHO 2013). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima uma incidência anual de 100 milhões de infecções com cerca de 500 mil pessoas, uma boa parte constituída de crianças, com febre hemorrágica do dengue (FHD) requerendo hospitalização (Bäck & Lundkvist 2013).

No continente americano, foram registrados, em 2010, mais de 1,7 milhões de casos de dengue, 50.235 casos graves, e 1.185 óbitos foram registrados, com uma incidência >200 casos/100.000 habitantes. Vários países excederam o total de casos nunca antes notificados, incluindo a introdução da dengue em Key West, Flórida, EUA. Países como Honduras, Caribe, Guadalupe, Martinica, República Dominicana e Porto Rico registraram um número de casos significantes (Brathwaite Dick et al. 2012).

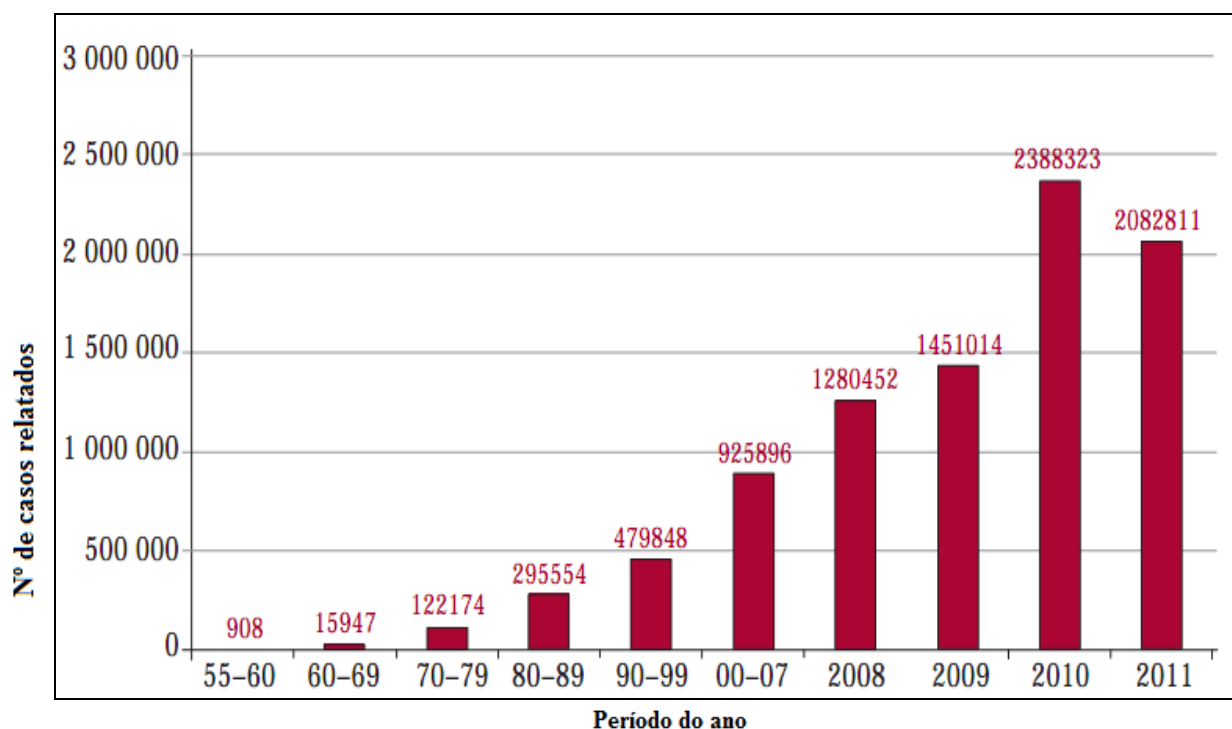


Figura 1.2: Média anual de casos de dengue e dengue grave reportado pela OMS e de países com casos de dengue, 1955–2011 (WHO 2013).

A respeito do ano de 2013, até a 21ª semana epidemiológica, 868.653 casos da doença foram registrados nas Américas. Desses, 8.406 casos foram dengue grave e 346 óbitos. No primeiro semestre do mesmo ano, foram relatadas epidemias de dengue em países como o Brasil, Costa Rica, Colômbia, Paraguai e República Dominicana (PAHO 2013).

Nos últimos 27 anos várias epidemias de dengue têm ocorrido no Brasil, com mais de oito milhões de casos notificados (Figura 1.3) (SVS/MS 2013, Silva Jr 2013). Em 2010, 1.029.678 casos de dengue, com 1.011.548 casos de dengue clássico (DC), 3.700 casos de febre hemorrágica da dengue (FHD) e 13.774 casos de dengue com complicações (DCC) e 656 óbitos. A região sudeste notificou 478.003 casos da forma clássica, com os estados de Minas Gerais e São Paulo contribuindo com cerca de 90% do total dos casos (SVS/MS 2013). O ano de 2010 destacou-se pelo número elevado de casos de dengue, sendo uma das maiores epidemias ocorrida no país. O sorotipo predominante foi o DENV-1 que reemergiu

no ano de 2009 (dos Santos et al. 2011). Já em 2013, houve 54,6% de casos a mais que o ano de 2010 com 1,4 milhões de pessoas afetadas (SVS/MS, 2013).

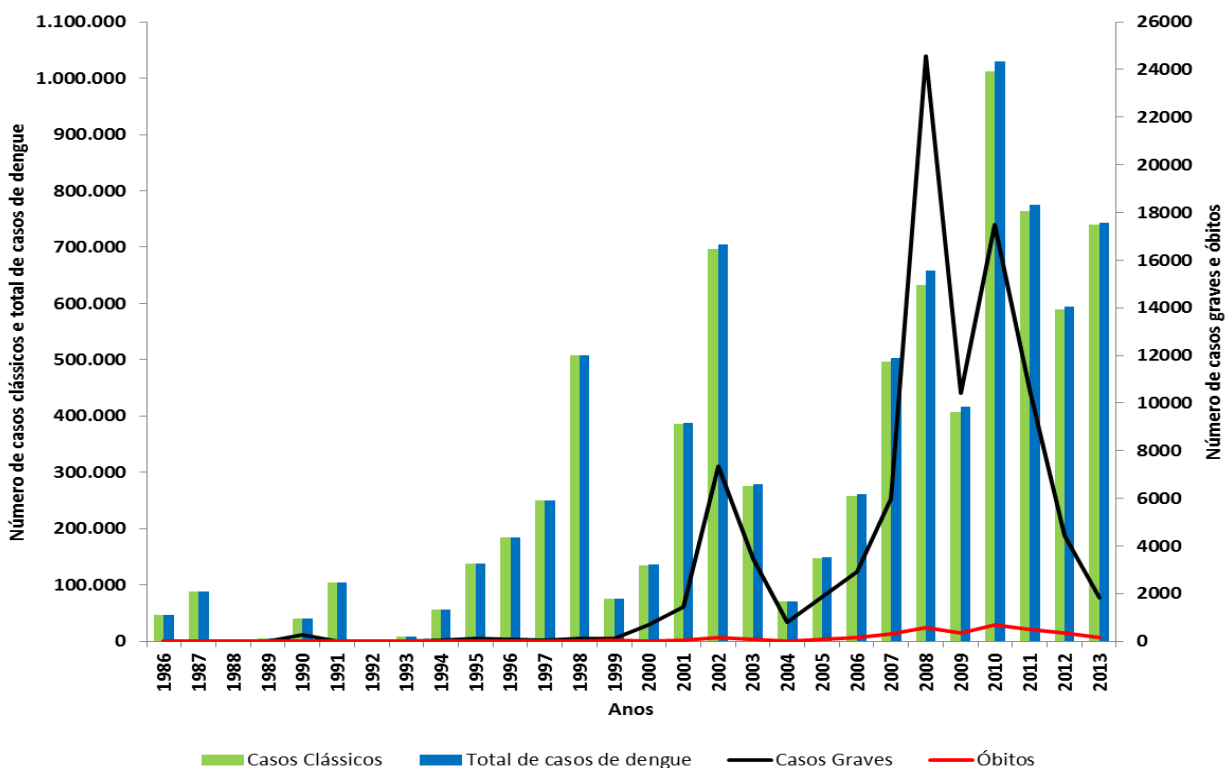


Figura 1.3: Número de casos de dengue notificados no Brasil, 1986-2013 (SVS/MS, 2013; Silva Jr, 2013).

Dos 775.060 casos ocorridos no país, em 2011, um total de 764.032 foi referente a casos de DC, 10.546 casos graves (7.744 por DCC e 2.802 por FHD) e 482 casos fatais. No ano de 2012 foram notificados 594.343 casos da doença, com 589.591 casos de DC, 4.425 casos graves (3.429 por DCC e 996 por FHD) e 327 óbitos (SVS/MS 2013).

Em 2013, até a 15ª semana epidemiológica foram registrados 742.475 casos de dengue no Brasil, com predominância do DENV-4 seguido do DENV-1. Os sorotipos 2 e 3 também foram identificados. Neste período foram confirmados 1.825 casos graves e 154 óbitos, porém ainda se encontram em investigação 1.768 casos considerados graves e 206 óbitos compatíveis com quadro clínico da dengue. O estado do Rio de Janeiro tem sido

importante para a epidemiologia da dengue, com a introdução de DENV-1 em 1986, DENV-2 em 1990, DENV-3 em 2000, DENV-4 em 2011 e em 2013, ao contabilizar 74.012 casos ficou entre os dez estados que concentram 93% (690.685) dos casos, notificados (Silva Jr. 2013).

O período de incubação do DENV no homem varia de 3 a 15 dias, após o qual a doença poderá evoluir para uma das formas clínicas. Estas variam de intensidade de acordo com as características do hospedeiro e do vírus. De acordo com a nova classificação recomendada pela OMS, cuja vigência no Brasil teve início no ano de 2014, houve alteração na definição de casos suspeitos de dengue antes definidos como dengue clássico (DC), dengue com complicações (DCC), febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome do choque por dengue (SCD) para: I) Dengue; II) Dengue com sinal de alarme e III) Dengue grave (OMS, 2009).

Para se definir como um caso suspeito de dengue, o paciente tem que residir ou ter viajado nos últimos 14 dias para uma área de ocorrência de transmissão de dengue ou que haja circulação de *Ae. Aegypti*. Além disso, estar febril (geralmente entre 2 e 7 dias), e apresentar duas ou mais das seguintes manifestações: náuseas, vômitos, exantema, mialgia, artralgia, cefaleia, dor retroorbital, petéquias ou prova do laço positiva, leucopenia.

Já os casos suspeitos de dengue com sinais de alarme, serão definidos como todo caso de dengue que, no período defervescência da febre apresente um ou mais dos seguintes sinais de alarme: dor abdominal intensa e contínua, ou dor a palpação do abdômen; vômitos persistentes; acumulação de líquidos (ascites, derrame pleural, pericárdico); sangramento de mucosas; letargia ou irritabilidade; hipotensão postural (lipotímia); hepatomegalia maior que 2 cm; e aumento progressivo do hematócrito;

Aqueles casos suspeitos de dengue grave incluem todo caso de dengue que apresenta um ou mais dos seguintes resultados abaixo:

- Choque devido ao extravasamento grave de plasma evidenciado por taquicardia, extremidades frias e tempo de enchimento capilar igual ou maior a três segundos, pulso

débil ou indetectável, pressão diferencial convergente menor ou igual a 20mmHg, hipotensão arterial em fase tardia, acumulação de líquidos com insuficiência respiratória;

- Sangramento grave, segundo avaliação do médico;

- Comprometimento grave de órgãos tais como: dano hepático importante (AST o ALT >1000), sistema nervoso central (alteração da consciência), coração (miocardite) ou outros órgãos;

As técnicas laboratoriais mais utilizadas para o diagnóstico da dengue, de acordo com a fase da doença (Figura 1.4), incluem: i) o isolamento viral em culturas de células onde a amostra deve ser coletada até o 5º dia do início dos sintomas (preferencialmente em até 03 dias de sintomas) durante a fase de viremia da dengue; e/ou ii) detecção do ácido nucléico viral pelo método de RT- PCR (transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase) sendo que a amostra deve ser coletada preferencialmente durante os cinco primeiros dias de sintomas, sendo até o 7º dia passível de realização do teste em casos excepcionais; iii) técnicas sorológicas a partir da pesquisa de anticorpos específicos IgM/IgG em que a coleta da amostra se dá a partir do 5º dia de doença; iv) captura de antígeno (NS1) realizada em amostras de pacientes com até 5 dias de sintomas de dengue, devendo dar preferência para amostras com até 3 dias do início dos sintomas e em todos os casos graves que necessitem do diagnóstico precoce da doença; ou v) a detecção de antígenos virais em tecidos através da técnica de imunohistoquímica (Igarashi 1978, Kuno et al. 1987, Chungue et al. 1989, Hall et al.1991, Lanciotti et al.1992, Miagostovich et al. 1997 & 1999, MS 2009).

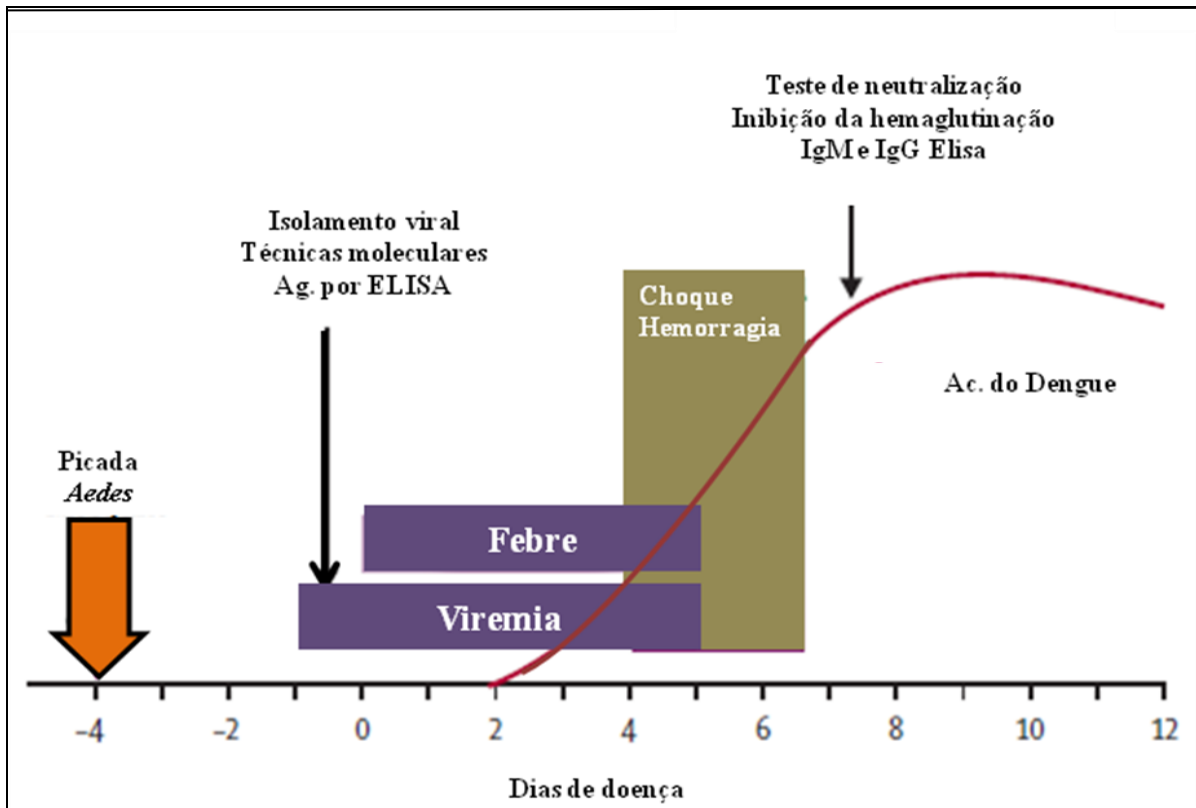


Figura 1.4: Esquema com as técnicas laboratoriais utilizadas no diagnóstico da dengue segundo a fase de doença. (Adaptado de Halstead 2009).

1.3 Rickettsioses

As rickettsioses são zoonoses causadas por bactérias emergentes e re-emergentes, com distribuição mundial, que são transmitidas por artrópodes (pulgas, ácaros, carrapatos e piolhos) (Wood & Artsob 2012).

Embora historicamente o termo rickettsiose faça referência também às proteobactérias dos subgrupos alfa-2a (bartonelas) e gama (*Coxiella burnetii*), a partir de estudos com base na análise genômica, taxonomicamente o termo deve se restringir, atualmente, aos agravos causados por proteobactérias do subgrupo alfa-1a, do gênero *Rickettsia*, pertencente à ordem Rickettsiales, família Rickettsiaceae (Mahajan 2012, Lemos 2013) (Figura 1.5).

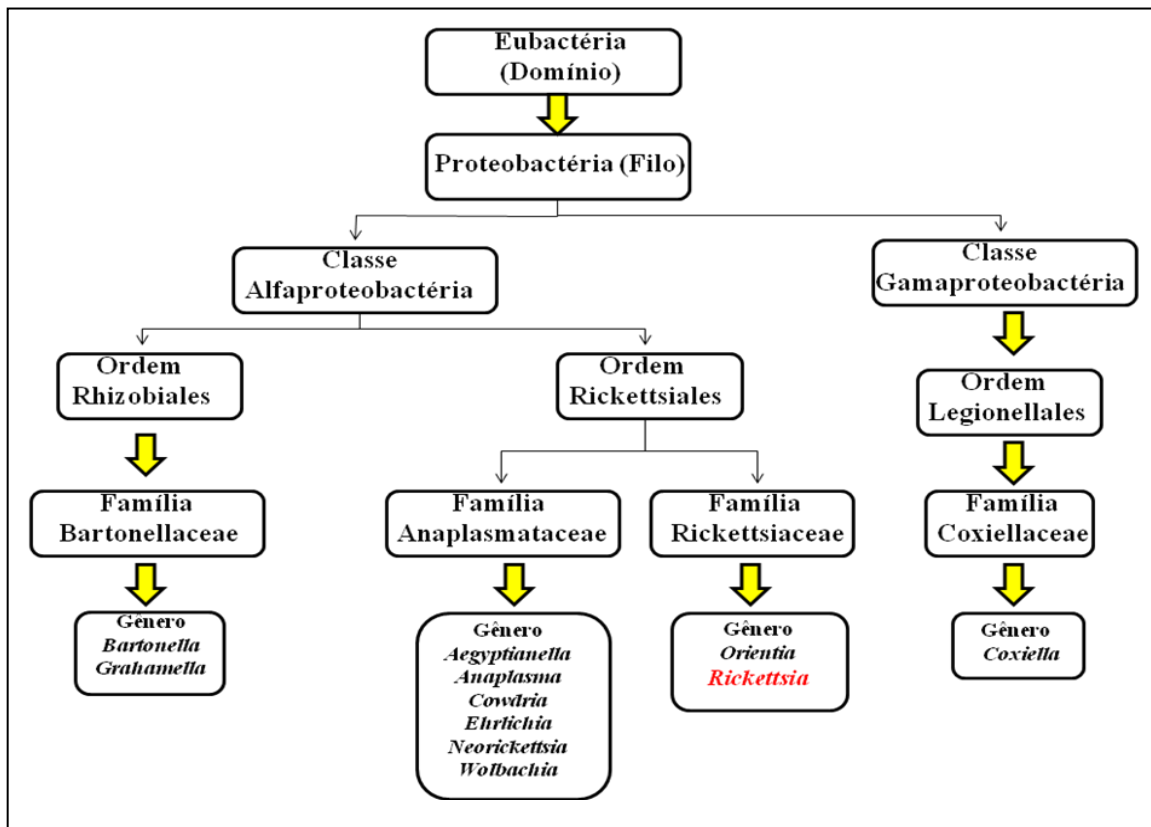


Figura 1.5: Esquema de classificação taxonômica das proteobactérias com ênfase nas rickettsias. (Lemos 2013).

1.3.1 Etiologia das Bactérias do Gênero *Rickettsia*

O gênero *Rickettsia* compreende bactérias intracelulares gram-negativas, pleomórficas, cocoides e cocobacilares ($0.3\text{--}0.5 \times 0.8\text{--}2.0\mu\text{m}$). O citoplasma destas bactérias contém ribossomos e filamentos de DNA e é limitado por uma parede celular constituída de lipopolissacarídeos, peptidoglicanos, uma proteína de 120 kDa, (*outer membrane protein*, *OmpB*), uma lipoproteína de 17kDa e uma proteína de superfície *OmpA* de 190kDa, sendo esta última específica para rickettsias do grupo da febre Maculosa (RGFM). Crescem em culturas de células de ovos embrionados ou em animais de laboratório e podem ser inativadas a 56°C por 30 minutos ou a 37°C por diversas horas ou ainda por formalina, fenol e anti-sépticos como álcool a 70%, iodo ou clorexidina (Elisberg e Bozeman 1979; Weiss e Moulder 1984; Olson e McDade 1994; Walker e Bouyer 2003; Parola et al. 2005; Walker 2007).

O gênero *Rickettsia* é classificado em quatro grupos que se baseiam em características biológicas, genéticas e anti-gênicas e concentram-se as bactérias de caráter patogênico mais comum ao homem e que se encontram descritos no Quadro 1.1 (Lemos 2013).

Quadro 1.1: Espécies de proteobactérias do gênero *Rickettsia*, segundo o grupo e doença humana (Lemos 2013).

Grupo	Agente Causador	Mecanismo de Transmissão	Doença em Humanos
Febre Maculosa	<i>R. rickettsii</i>	Picada de Carrapato	FMB e FMMR
	<i>R. conorii conorii</i>		FMM
	<i>R. conorii indica</i>		Tifo do Carrapato Indiano
	<i>R. conorii caspea</i>		Febre de Astrakhan
	<i>R. conorii israeli</i>		Febre Maculosa de Israel
	<i>R. sibirica sibirica</i>		Tifo Siberiano do Carrapato
	<i>R. sibirica mongolotimonae</i>		Febre Maculosa sem nome
	<i>R. australis</i>		Tifo Australiano do Carrapato
	<i>R. japonica</i>		Febre Maculosa Oriental
	<i>R. aeschlimannii</i>		Febre Maculosa sem nome
	<i>R. africae</i>		Febre Africana do Carrapato
	<i>R. honei</i>		Febre Maculosa de Flinders Island
	<i>R. slovaca</i>		Tibola
	<i>R. parkeri</i>		Febre Maculosa sem nome
<i>R. raoultii</i>	Tibola		
	<i>R. heilongjiangensis</i>	Riquetsioses do Extremo Oriente	
Transicional	<i>R. akari</i> <i>R. australis</i> <i>R. felis</i>	Picada de Ácaro Picada de Carrapato Fezes de Pulgas (?)	Riquetsiose Variceliforme Tifo do Carrapato de Queensland Tifo da Pulga do Gato
Tifo	<i>R. prowazekii</i>	Fezes de Piolho	Tifo Epidêmico
	<i>R. typhi</i>	Fezes de Pulga	Tifo Murino
Ancestral	<i>R. bellii</i> <i>R. canadensis</i>	Picada de Carrapato	FMMR-Like Não Determinado

FMB: Febre Maculosa Brasileira; FMMR: Febre Maculosa das Montanhas Rochosas; FMM: Febre Maculosa do Mediterrâneo.

1.3.2 Distribuição Geográfica das Rickettsioses do Grupo da Febre Maculosa

O grupo da febre maculosa é constituído por mais de 25 espécies e tem ampla distribuição mundial (Figura 1.6), incluindo a espécie *R. rickettsii*, que determina doença conhecida na América do Norte como febre maculosa das Montanhas Rochosas (FMMR) e também em outras regiões do continente americano incluindo o Brasil, onde a infecção é reconhecida como febre maculosa brasileira (FMB).

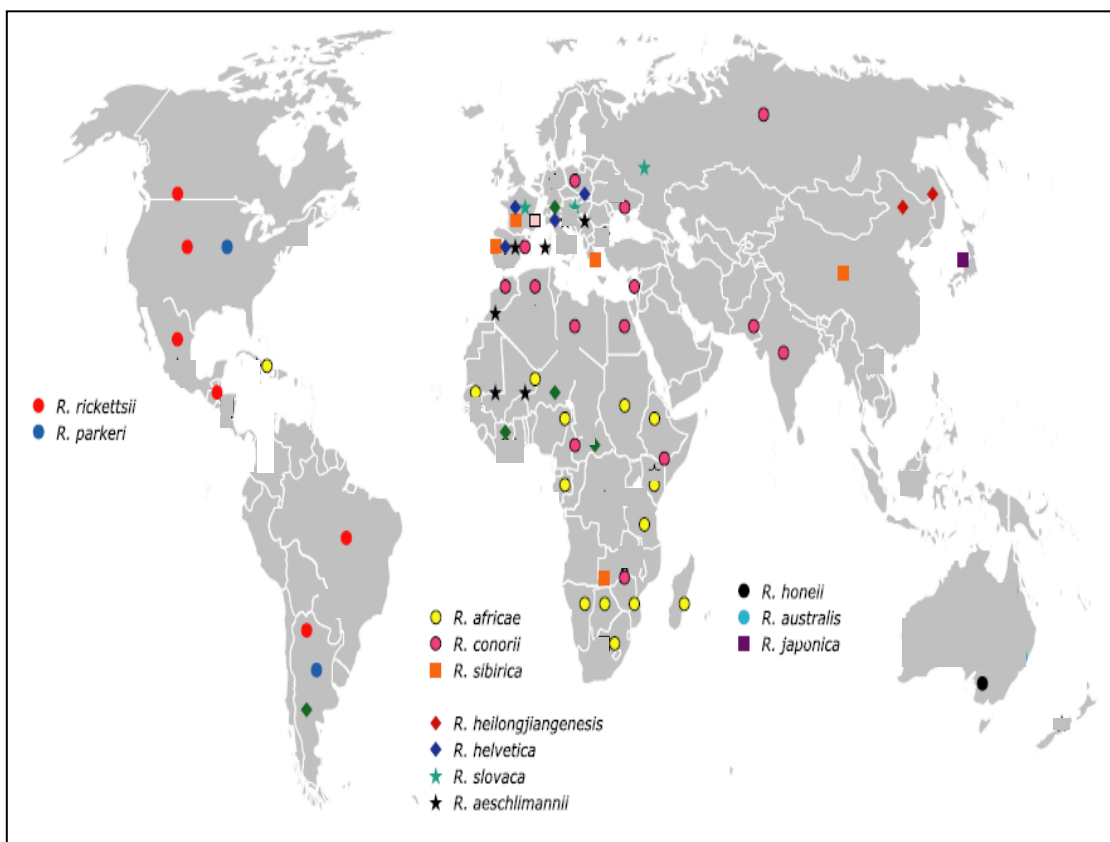


Figura 1.6: Distribuição geográfica de rickettsias patogênicas do grupo da febre maculosa (Adaptado de Wood & Artsob 2011).

As rickettsioses transmitidas por carrapatos têm distribuições geográficas específicas, diretamente dependentes da distribuição de seus vetores, assim como também ao aumento no número de casos de rickettsioses corresponde a períodos do ano em que o

vetor está em desenvolvimento, especialmente quando os estágios de larva e ninfa dos carrapatos estão ativos (Raoult & Parola, 2007; Lemos et al. 1997b).

No Brasil, recentemente foi identificada uma nova espécie causadora de doença humana, uma espécie associada com *R. parkeri*, *R. africae* e *R. sibirica*, responsável por uma síndrome exantemática papulo-eritematosa associada com adenomegalia e escara, reforçando a importância da identificação taxonômica da espécie (Spolidorio et al. 2010, Silva et al. 2011).

1.3.3 Febre Maculosa Brasileira

A ocorrência da febre maculosa foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos por Wood e Maxcy na última década do século XIX. A identificação do carrapato como o vetor desta nova doença de elevada letalidade foi, posteriormente, no início do século XX, estabelecida por Ricketts (Riley 1981; Chen e Sexton, 2008).

Na América do Sul, desde o século XVII existem relatos sobre a ocorrência do tifo do carrapato ou do sarampão, mas os primeiros registros oficiais da FMB ocorreram em São Paulo, em 1929, por José Toledo Piza (Piza et al. 1932) quando a doença foi denominada de “typho exanthemático de São Paulo” e que foi posteriormente identificada nas décadas de 1930 e 1940, respectivamente, nos estados de Minas Gerais, por Octávio Magalhães, e do Rio de Janeiro (Magalhães 1952, Toste & Bretz 1941).

Desde então, casos confirmados de FMB já foram descritos em 14 estados brasileiros (Figura 1.7). A região sudeste é onde se concentra a maioria dos casos confirmados destacando em termos de maior ocorrência os estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, respectivamente. Nenhum óbito foi registrado nos casos confirmados de FMB no estado de Santa Catarina, onde o agente etiológico até o momento não foi identificado (SINAN 2013b, Lemos 2013).

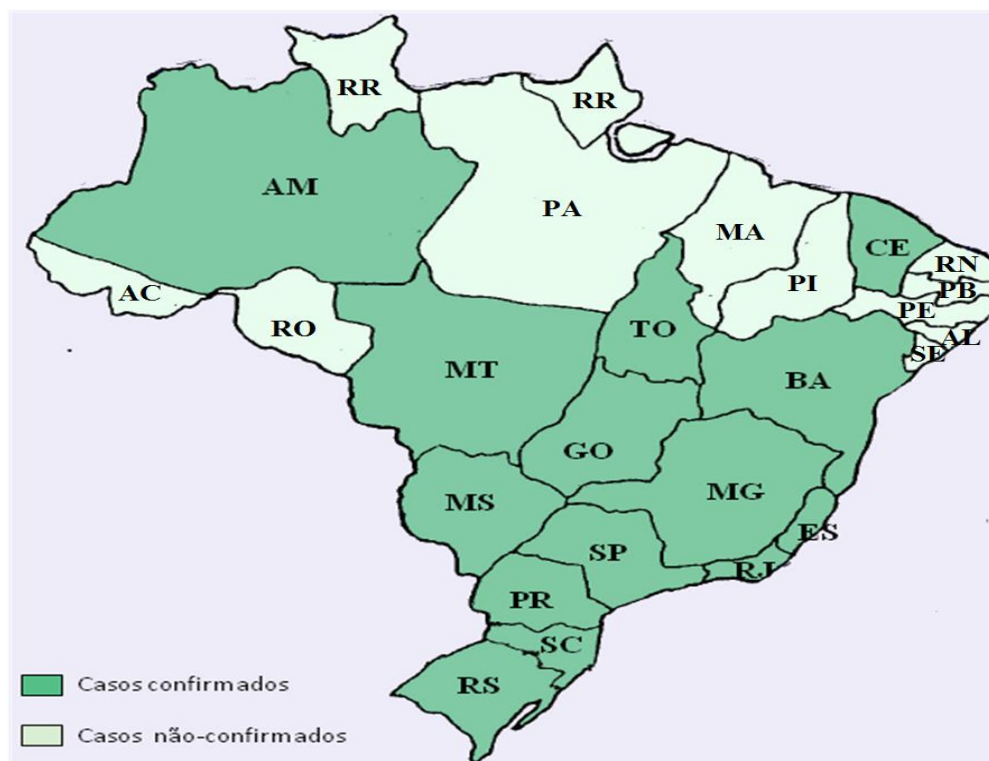


Figura 1.7: Estados com casos confirmados de febre maculosa brasileira no Brasil. (SINAN 2013a).

Considerando que a FMB foi incluída na lista de agravos de notificação compulsória desde 2001, pela portaria MS nº 1.943 de 18/10/01, segundo o Ministério da Saúde, 67% das pessoas acometidas por FMB são do sexo masculino. Em relação aos relatos de exposição, destaca-se o contato com carrapatos (75%), cães e gatos (45%), equinos (19%) e capivaras (14%) e a zona rural representou 45% dos prováveis locais de infecção (MS 2012). Dados do SINAN (2013a) mostram que, entre o período de 2001 a 2013, foram confirmados 1.071 casos, embora estes números possam estar subestimados em decorrência da baixa suspeição clínica, em especial, em períodos de epidemias de doenças como dengue e leptospirose, cuja manifestação clínica se confunde com a FMB (Figura 1.8).

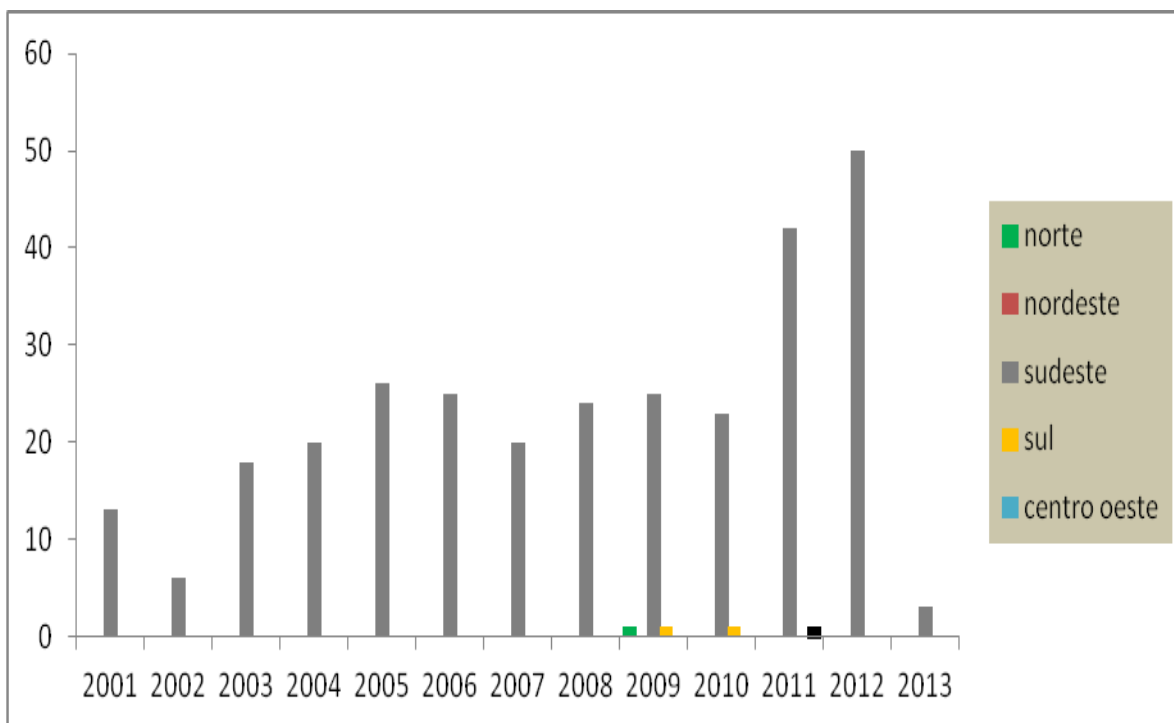


Figura 1.8: Casos confirmados de febre maculosa brasileira por região entre os anos de janeiro de 2001 a junho de 2013. (SINAN 2013a).

No Rio de Janeiro, a primeira descrição da FMB foi em 1941, quando quatro casos ocorreram na localidade de Perobas, em Itaboraí (Tostes & Bretz 1941). Desde então, somente na década de 1970 novos casos foram relatados e casos isolados passaram a ser notificados como os surtos ocorridos em Petrópolis, no distrito de Itaipava, região serrana fluminense, em 2005, quando 2 dos 5 pacientes infectados faleceram, e, posteriormente, em Resende, região do Vale do Paraíba, 2005, quando foram identificados 5 casos com 2 óbitos. Subsequentemente, no município do Rio de Janeiro, novos casos fatais foram confirmados em área peri-urbana, onde ocorreram oito casos fatais de síndrome febril e hemorrágica sem esclarecimento etiológico e somente em um destes casos foi possível confirmar o diagnóstico de FMB através de técnica molecular (PCR) (Lemos et al. 2002; Lamas et al. 2008).

1.3.4 Dinâmica de Transmissão

A manutenção do ciclo enzoótico de *R. rickettsii* depende da transmissão cíclica entre carrapatos da família *Ixodidae*, em qualquer fase da vida (larva, ninfa e adulto) e dos vertebrados amplificadores que podem diferir de uma área geográfica para outra. Diversos tecidos dos carrapatos são infectados, incluindo as glândulas salivares e ovários (McDade & Newhouse 1986).

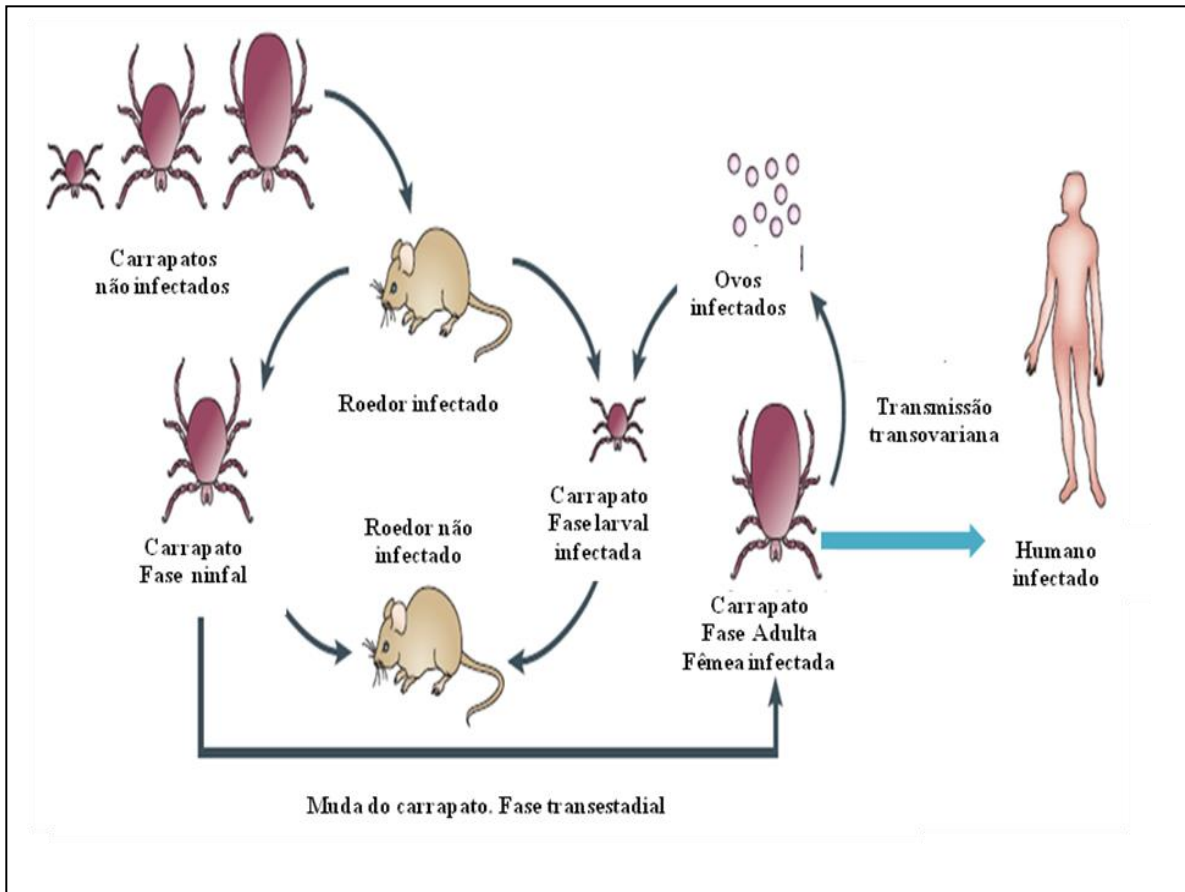


Figura 1. 9: O ciclo de vida de rickettsias transmitidas por carrapatos. (Adaptado de Walker & Ismail 2008).

Os carrapatos são os reservatórios-vetores por serem responsáveis pela manutenção de *R. rickettsii* na natureza, em função da transmissão transovariana e transestadial (Figura

1.9). Essa característica permite ao carrapato permanecer infectado durante toda a sua vida e também por muitas gerações após a infecção inicial (McDade & Newhouse 1986).

No Brasil, a infecção pela espécie *R. rickettsii* se dá pela picada de carrapatos de várias espécies das quais merece destaque o da espécie *Amblyomma cajennense*. Conhecido como “carrapato do cavalo”, em decorrência do seu comportamento eclético, por parasitar tanto animais poiquilotérmicos quanto homeotérmicos (Lemos 2013).

Além disso, tanto outras espécies do gênero *Amblyomma* (*A. aureolatum* e *A. ovale*) como *Rhipicephalus (Boophilus) sanguineus* e *Boophilus (Boophilus) microplus* apresentam-se naturalmente infectados e/ou podem participar, eventualmente, na transmissão da rickettsia para o homem, comprovando a amplitude da FMB (Monteiro et al., 1931, Dias 1939, Gomes 1933, Magalhães 1952, Lemos et al. 1997a, Labruna et al. 2004, Guedes et al. 2005, Horta et al. 2007, Sangioni et al. 2005). Recentemente, o carrapato da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) sanguineus*, conhecido popularmente como carrapato marrom do cão, foi identificado, pela primeira vez, com infecção natural por *R. rickettsii* no Rio de Janeiro (Rozenal et al. 2009). É importante ressaltar que este artrópode vive em ambientes peridomiciliares, alimentando-se principalmente em cães e ocasionalmente em humanos, e torna-se um importante agente na epidemiologia da doença na região. O homem é apenas um hospedeiro acidental.

Contrariamente aos carrapatos, os vertebrados amplificadores raramente perpetuam as rickettsias, embora muitas espécies apresentem sorologia reagente para esta zoonose, como o cão doméstico, gato, cabra, cavalos, lebre, cachorro do mato, gambá, furão, paca, preá, capivara, quati, diversas espécies de morcego, entre outras (Dias 1939; Dias & Martins 1939; Magalhães & Rocha 1942; Magalhães 1952; Lemos 1996).

A transmissão só ocorre mediante a aderência dos carrapatos por no mínimo de 3 a 4h dependendo da temperatura, entre outros fatores (Lemos 2013). A maioria dos casos de FMB (80%) ocorre entre os meses de maio a outubro, período de maior atividade do vetor transmissor, embora casos possam ocorrer todo o período do ano, confirmando a distribuição sazonal da doença em consonância com a atividade do carrapato (Lemos 2013).

1.3.5 Patogenia

Após a picada do carrapato infectado, as rickettsias disseminam-se através dos vasos linfáticos e dos pequenos vasos sanguíneos, alcançando vários órgãos como a pele, cérebro, pulmões, coração, fígado, baço, pâncreas e trato gastrointestinal.

Nos tecidos atingidos, as rickettsias ligam-se a receptores que contêm colesterol, fixando-se às células do endotélio através de proteínas específicas (OmpA e OmpB) e interagindo com um receptor celular (proteína quinase Ku70). A invasão do endotélio vascular ocorre por fagocitose induzida e a partir da replicação atingem as células da musculatura lisa. No interior da célula, a bactéria utiliza a fosfolipase A, promove a lise da membrana vacuolar e escapa para o citosol (Del Fiol et al. 2010, Lemos 2013). Além disso, ainda no interior da célula, a bactéria utiliza a proteína Rick A que ativa a Arp 2/3 e aciona a polimerização da actina A que age como propulsora da bactéria pelo citoplasma da célula. Essa propulsão resulta em uma invaginação na direção das células adjacentes e rápida disseminação intracelular dentre as células endoteliais de vasos sanguíneos e linfáticos (Chen & Sexton 2008, Walker 2007).

Com a penetração nas células endoteliais, ocorre uma resposta inflamatória de fase aguda, mediada pela produção de citocinas como TNF- α e IFN- γ , resultando em aumento de permeabilidade vascular, hipovolemia, com consequente hipoalbuminemia. Ao mesmo tempo, ocorre hiponatremia, decorrente da secreção de hormônio antidiurético em resposta à hipovolemia. Em todos os sítios de infecção, há um consumo excessivo de plaquetas, o que leva à trombocitopenia em cerca de 40% ou mais dos pacientes infectados. Com a extensa lesão endotelial, instala-se um estado procoagulante, com ativação da cascata da coagulação, liberação de trombina, aumento de agregação plaquetária e aumento de fatores antifibrinolíticos (Del Fiol et al. 2010).

O quadro clínico do paciente agrava-se com a trombose de pequenos vasos do coração, rins, pulmões e cérebro. Além disso, devido ao bloqueio de pequenos vasos, ocorrem necrose tecidual e isquemia cerebral, principalmente do mesencéfalo e região dos

núcleos. O possível mecanismo para a injúria celular endotelial causada pelas rickettsias parece ser a depleção de ATP, o que levaria a uma diminuição de funcionamento da bomba de sódio na membrana celular. Ocorre ainda a ativação das células endoteliais após a infecção, com concomitante produção de citocinas que estimulam a resposta de fase aguda, com ativação de fagócitos e células NK. Linfócitos CD8 e células NK são encontradas no infiltrado perivascular, possivelmente para controlar a infecção, uma vez que ambas têm importante papel na resposta imune contra microrganismos intracelulares. A resposta inflamatória e imunológica mediada pelo aumento de citocinas Th1 e Th2 parece ser importante no processo de contenção da doença (Del Fiol et al. 2010)

1.3.6 Manifestações Clínicas

A gravidade da FMB varia de leve a grave com evolução para óbito. O período de incubação dura em média sete dias com variação de 2 a 14 dias. O paciente desenvolve um quadro febril inespecífico, com mal-estar generalizado, cefaleia, mialgia e artralgia. Esses sintomas podem ser semelhantes aos de muitas outras infecções bacterianas ou virais e, assim, a suspeita da doença no quadro clínico inicial é rara, exceto se o paciente ou um familiar relatar uma história recente de picada de carrapato. É importante ressaltar que a picada de carrapato é observada em torno de 60% dos casos (Treadwell 2000, Dalton 1995, CDC 2006). Várias outras manifestações clínicas podem ocorrer como náuseas, vômitos, anorexia, dor abdominal, diarreia e fotofobia assim como também comprometimento neurológico, alterações pulmonares, insuficiência renal e miocardite (Renvoisé et al. 2009).

A tríade clássica constituída de febre, cefaleia e exantema raramente está presente nos estágios iniciais da doença. O exantema é o sinal mais importante e geralmente surge entre o terceiro e quinto dia de doença, mas pode estar ausente em 15 a 20% dos pacientes (Helmick et al. 1984). Assim, menos de 5% dos pacientes em casuística norte-americana podem apresentar essa tríade nos primeiros três dias de sintomas, 60-70% até o fim da 2ª semana e 30% não apresentam a tríade clássica, tornando o diagnóstico difícil (Walker & Raoult 2005). Inicialmente o exantema é de coloração rósea, macular, após 1 a 3 dias,

torna-se macular e papular, e posteriormente, após 2 a 4 dias, pode evoluir para exantema petequeial e, eventualmente, também para necrose e gangrena (Figura 1.10) (Magalhães 1952, Lemos et al 2001).



Figura 1.10: Exantema em paciente do Rio de Janeiro com Febre Maculosa Brasileira causada por *Rickettsia rickettsii* (Lemos 2009).

Embora a suspeita de FMB deva ser realizada com base na tríade clássica - febre, cefaleia e exantema - a ausência de exantema pode ser observada em pacientes idosos e em pacientes submetidos à antibioticoterapia específica precoce. Em pacientes negros, o exantema pode não ser detectado, o que leva a concluir que somente este sinal clínico não é condição para suspeita clínica da doença. O envolvimento de palmas da mão e plantas dos pés é característico da doença, porém costuma estar presente nas formas avançadas. Além disso, outras doenças podem causar exantema na palma das mãos e planta dos pés como no caso da sífilis, meningococemia, infecção por *Streptobacillus moniliformis* e enterovirose, o que leva a considerar que o exantema de palmas das mãos e plantas dos pés não são manifestações exclusivas da febre maculosa (Pickering et al. 2006).

Autores descrevem, academicamente, duas formas clínicas de febre maculosa, a clássica e a fulminante, definindo como casos fulminantes cujo óbito ocorre até o 5º dia do início dos sintomas (Walker & Raoult 2005, Walker et al.1983).

Em crianças, os sinais e sintomas da infecção não são específicos. A febre é o primeiro sintomas a aparecer, ocorre com aproximadamente 97% das crianças. Em média, 95% têm rash comparado com 80% dos adultos. Em crianças, o exantema geralmente aparece no primeiro ou segundo dia de doença, mas pode aparecer no 3º ou 4º dia ou além, evento que é mais comum em adultos. A clássica tríade de febre, exantema e dor de cabeça ocorre na maioria e geralmente não é aparente no início do curso da doença. A dor de cabeça se apresenta em 40-60% em pacientes menores de 15 anos sendo assim, mais intensa em crianças mais velhas e em adultos. No entanto é preciso considerar que crianças menores não fornecem informações sobre os sintomas como a cefaleia (Chen 2008; Buckingham et al. 2007; Helmick et al. 1984; Minninear et al. 2009).

Com a identificação de uma nova espécie de RGFM, relacionada às espécies *R. africae*, *R. parkeri* e *R. sibirica*, nos estados da Bahia e de São Paulo, além da FMB, pacientes no Brasil podem apresentar, diferente do previamente descrito, um quadro febril associado com exantema caracteristicamente papular, com enantema, adenomegalia e cancro de inoculação (Silva et al. 2011; Spolidorio et al. 2010).

1.3.7 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico da febre maculosa é eminentemente clínico-epidemiológico e a confirmação laboratorial deve ser empregada de acordo com a fase da doença (Figura 1.11). Na figura 1.11 é apresentado um esquema no qual é possível observar o período de surgimento da escara (cancro de inoculação), que surge dentro de alguns dias após a picada dos artrópodes e evolui para uma placa eritematosa e endurecida. É importante lembrar, no entanto, que na FMB, esta lesão inicial não é detectada. A febre surge posteriormente associada com outros sinais e sintomas, com o surgimento de exantema, que pode ser

maculopapular, papulovesicular e petequiral, no 3º-5º dia de doença com duração de 5-8 dias (Richards 2012).

O diagnóstico é mais frequentemente realizado a partir de testes sorológicos, retrospectivamente, e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é considerada padrão-ouro. Estudos demonstram uma sensibilidade de 84,6% a 100% e uma especificidade de 99,8 a 100%, dependendo do ponto de corte escolhido. Em relação ao tempo de coleta, a sensibilidade varia de 46% (amostras coletadas entre o 5º e 9º dias após o início da doença) a 100% (amostras coletadas depois do 29º dia) (Brouqui et al. 2004).

A análise das amostras é realizada mediante a coleta de duas amostras de soro pareadas obtidas em um período de duas a quatro semanas, após o início da doença. A sensibilidade e especificidade variam entre as espécies e a confirmação de uma infecção recente se dá com o aumento de quatro vezes no título de anticorpos da classe IgM ou IgG (Lemos 2013, Renvoisé et al. 2009).

Os anticorpos não são detectáveis no momento da doença aguda e a RIFI pode implicar em resultados falso-negativos. Outra limitação desta técnica são as reações cruzadas entre as espécies ou até mesmo entre outras bactérias intracelulares (Renvoisé et al. 2009). Adicionalmente, o teste sorológico não detecta a espécie de rickettsia e a caracterização do agente pelo teste molecular (PCR) passa a ser necessária (Lemos 2013).

A análise molecular através da PCR é utilizada como ferramenta sensível para a detecção do DNA da bactéria bem como sua identificação a partir de amostras de sangue, coágulo, soro, fragmentos de tecidos recolhidos por biópsia ou mesmo em carrapatos recuperados do paciente. Deve ser realizada na fase inicial, até 7 dias da doença, quando a produção de anticorpos ainda não é detectada (Richards 2012). A PCR, junto com o sequenciamento, tem sido utilizada com mais frequência e tem sido considerada a técnica mais indicada para óbitos e casos graves (Walker & Bouyer 2003; Fournier & Raoult 2008; Parola et al. 2005). O isolamento de *R. rickettsii* é realizado através do sistema “shell vial” modificado, no Brasil, por Melles et al. (1992 & 1999) em cultura de células e pode ser feita a partir de sangue, biópsia de pele ou artrópodes (Lemos 2013). É realizado somente

em laboratórios de biossegurança nível 3 com pessoal qualificado e portanto, não é empregada na rotina laboratorial e é conclusivo quando positivo (Olson & McDade 1994; Renvoisé et al. 2009)

A realização da histopatologia se dá a partir biópsia de lesões de pele ou, em casos de necropsia, em fragmento de tecido (pulmão, fígado, baço, coração, rim, músculos e cérebro) fixados em formalina a 10% e incluídos em parafina (Lemos 2013, Del Fiol et al. 2010).

A imunohistoquímica, utilizada para o diagnóstico em biópsia de pele, é considerada como o método mais sensível para a confirmação da febre maculosa na fase inicial da doença, em necropsias, tecidos frescos ou preservados em formalina, embebido em parafina (Lemos 2013). Essa técnica apresenta elevada sensibilidade e especificidade e seus resultados consistem em demonstração positiva de antígenos em células endoteliais de amostras de biópsia ou autópsia (Parola et al. 2005).

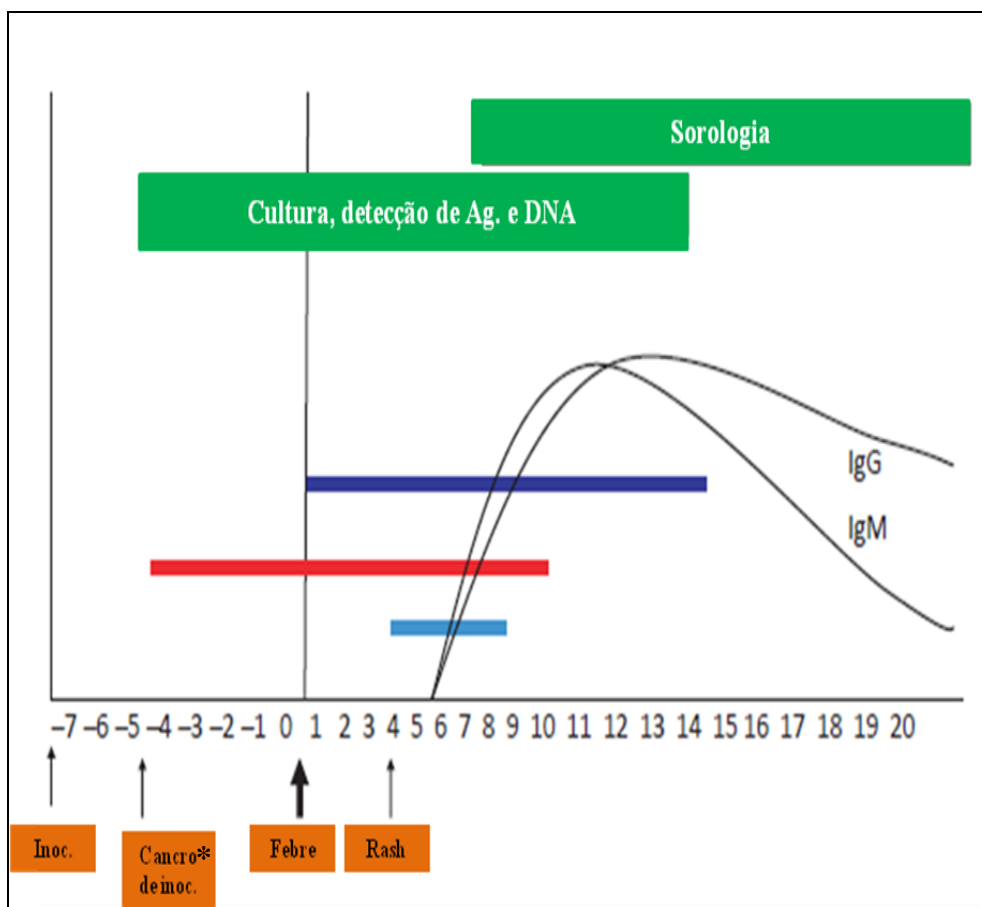


Figura 1.11: Esquema com as técnicas laboratoriais utilizadas no diagnóstico da febre maculosa, segundo a fase de doença (Richards 2012).

*Na FMB, que é causada por *R. rickettsii*, não há relato de cancro de

1.3.8 Diagnóstico Diferencial

No estágio inicial, sem exantema, a FMB pode se assemelhar à dengue, leptospirose, influenza, hepatite, salmonelose assim como também outras rickettsioses, Já na fase tardia, com exantema, assemelha-se à meningococemia, dengue, rubéola, infecção por enterovírus, histoplasmose, mononucleose infecciosa entre outras doenças. A meningococemia é o diagnóstico diferencial mais importante, já que possui elevada letalidade e o emprego do tratamento empírico deve ser imediato (Lemos 2013).

1.3.9 Tratamento

O tratamento da FMB deve ser baseado na história clínica, sintomas, exames físicos e achados laboratoriais. A história epidemiológica, com observação para relato de picada de carrapato, ou contato com animais nos últimos 14 dias, viagem recente para área endêmica para FMB ou história de doença similar em outros membros da família ou entre colegas de trabalho e até a presença de animais domésticos doentes (Lemos 2013).

A suspeita clínica e epidemiológica indica a necessidade de tratamento empírico (Paddock et al. 2008). Há indicação de tratamento oral com doxiciclina para todos os casos não graves já que é a droga de escolha para o tratamento empírico em todas as faixas etárias (Pickering et al. 2006). A doxiciclina deve ser administrada na dose de 100 mg via oral, a cada 12 horas para adultos e 2,2 mg/kg para indivíduos com peso menor ou igual a 45kg (Del Fiol et al. 2010).

Quando o paciente apresenta um quadro de náuseas, vômitos ou forma grave da doença, com choque hipovolêmico, alterações hemodinâmicas graves, coma ou falência de múltiplos órgãos, o antibiótico de ser administrado por via intravenosa. Isso porque o nível sérico ideal do antibiótico por via oral não é atingido já que nos casos clássicos de sepsis por agentes bacterianos mais comuns, sabe-se que ocorre má perfusão esplâncica, com hipoperfusão do trato gastrointestinal e como consequência a absorção intestinal do fármaco ativo fica prejudicada (Lemos 2013).

Por isso, embora alguns estudos mostrem a tetraciclina/doxiciclina como primeira escolha de tratamento quando comparadas ao cloranfenicol, este último deve ser sempre na terapêutica de casos graves da FMB (Lemos 2013) no Brasil, considerando a inexistência de doxiciclina endovenosa disponível em nosso território. A dose do cloranfenicol é de 1 g a cada 6 horas para adultos e para criança a dose total diária varia de 50 a 75 mg/kg, divididos em quatro doses diárias (Del Fiol et al. 2010).

O tratamento específico deve se prolongar por pelo menos sete dias ou estendido até 2 dias após o término da febre (Del Fiol et al. 2010).

2. JUSTIFICATIVA

O estado do Rio de Janeiro, desde a década de 1980, enfrenta contínuas epidemias de dengue. Até a 15ª semana epidemiológica do ano de 2013 foram registrados 74.012 casos ficando entre os dez estados que concentram 93% dos casos notificados e de acordo com dados disponibilizados pelo LIRAA (levantamento rápido do índice de infestação de *Aedes aegypti*) está entre as capitais do país em situação de risco para a doença. Em um cenário de epidemia, praticamente todos os casos febris agudos passam a ser considerados suspeitos de dengue e o diagnóstico diferencial com doenças causadas por outros agentes infecciosos como rickettsias e leptospiras, que também cocirculam no estado, frequentemente não é considerado e, assim, negligenciado.

Além disso, a identificação de centenas de casos suspeitos de dengue, que foram laboratorialmente negativos, associada com a inexistência de uma etiologia definida, alerta para a necessidade do exercício do diagnóstico diferencial, com a inclusão da FMB. Neste contexto, a ocorrência de casos fatais de FMB, seja como surto, como ocorreu em 2005 em Itaipava, seja como doença do viajante e associada com turismo como ocorreu em 2008 com um paciente sul-africano, ou nas dezenas de casos, cuja impressão diagnóstica inicial foi dengue, reforça a assertiva.

De acordo com a problemática supracitada, a pesquisa da FMB em amostras de casos suspeitos, mas descartados de dengue, além de contribuir para o esclarecimento etiológico de casos febris agudos sem definição diagnóstica no estado do Rio de Janeiro, poderá auxiliar para a maior compreensão desta zoonose transmitida por carrapatos, cujo desconhecimento por parte da classe médica tem sido tão elevado quanto a letalidade observada, consequência do diagnóstico e tratamento específicos ausentes ou mesmo tardios.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a presença da infecção por *R. rickettsii* em amostras de pacientes com suspeita de dengue, mas sorologicamente negativos no estado do Rio de Janeiro durante o período de janeiro de 2010 a junho de 2011.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar a presença de DNA de *R. rickettsii* em amostras biológicas de casos suspeitos de dengue encaminhadas para o LACEN, sorologicamente negativos para dengue, durante o período de janeiro de 2010 a junho de 2011 no estado do Rio de Janeiro;
- Descrever os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes incluídos no estudo;
- Caracterizar molecularmente as rickettsias recuperadas nas amostras dos casos de febre maculosa identificados no estudo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho e Local do Estudo

O trabalho foi realizado no Laboratório de Referência Nacional para Rickettsioses, Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses (LHR) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fiocruz/RJ e contou com apoio financeiro do IOC/Fiocruz.

Trata-se de um estudo retrospectivo, descritivo baseado em dados secundários e de amostras biológicas de casos suspeitos de dengue, mas sorologicamente negativos (IgM-Panbio) para dengue, no estado do Rio de Janeiro, durante o período de janeiro de 2010 a junho de 2011.

Os dados e as amostras foram cedidos ao LHR pelo Laboratório Central Noel Nutels (LACEN/RJ) para a pesquisa de FMB, no contexto do diagnóstico diferencial, utilizando análise molecular - reação em cadeia da polimerase (PCR). Os dados clínico-epidemiológicos secundários foram obtidos a partir das fichas epidemiológica de requisição de exame laboratorial para dengue, contendo o histórico de cada paciente e incluídos no banco de dados do LHR para posterior análise.

4.2 Análise das Fichas Epidemiológicas e Critérios de Inclusão

Inicialmente, as amostras biológicas selecionadas foram definidas após levantamento e análise cuidadosa de todas as fichas dos pacientes com suspeita de dengue mas soronegativos (IgM - Panbio), sem etiologia definida. As fichas sem informações sobre município, sexo, idade, data de coleta, data dos sintomas e letra ilegível foram excluídas do estudo assim como as amostras cujas fichas não foram encontradas.

Neste contexto, após essa primeira etapa, foi estabelecido que do total de pacientes com suspeita de dengue, somente amostras biológicas que atendessem a todos os critérios de elegibilidade enumerados abaixo que seriam submetidas à pesquisa de FMB:

- i) Ter qualquer idade, de ambos os sexos e ser residente no estado do Rio de Janeiro, em municípios que já notificaram casos de FMB entre os anos de 2008 a 2012 (Figura 6.7). Considerando a escassez da disponibilidade de insumos, nos municípios com elevado número de amostras, houve a seleção apenas dos bairros e áreas circunvizinhas onde casos de FMB foram confirmados;
- ii) Ter amostras de sangue com volume adequado e dados clínico- epidemiológicos mínimos disponíveis;
- iii) Apresentar, no máximo, sete dias de duração de doença desde o início do quadro clínico;
- iv) Preencher os critérios clínicos mínimos em que o paciente apresente febre, cefaleia e mialgia;

Além disso, foram também selecionados todos os casos que evoluíram para óbito, independente da ocorrência de casos notificados de FMB no município de origem.

4.3 Descrição das Variáveis Estudadas

Os dados constantes nas fichas epidemiológicas foram analisados e os casos que atendessem aos critérios de inclusão estabelecidos foram digitados em um banco de dados construído especialmente para esta pesquisa com o programa Microsoft Office Excel XP.

Com relação às informações demográficas, as variáveis de faixa etária, sexo, mês e ano no qual se iniciaram os sintomas foram analisadas. A distribuição da faixa etária dos pacientes foi estabelecida considerando as seguintes faixas etárias: < 1, 1-4, 5-9, 10-14, 15-19, 20-29, 30-39, 40-49, 50-59, 60-69, 70-79 e 80e+. Os municípios de residência também foram listados.

A partir do levantamento das variáveis clínico-epidemiológicas disponíveis nas fichas epidemiológicas, foram avaliados os municípios de residência, a data dos primeiros sintomas, data de coleta, tempo decorrido entre data dos primeiros sintomas e data da coleta e óbito. Os sintomas clínicos listados na ficha do SINAN para FMB são febre, cefaleia, mialgia, dor abdominal, vômito, náuseas, exantema, diarreia, icterícia, hiperemia conjuntival, hepato/esplenomegalia, petéquias, manifestações hemorrágicas, linfadenopatia, convulsão, necrose de extremidades, prostração, choque/hipotensão, coma, sufusão hemorrágica, alterações respiratórias, oligúria e anúria (ANEXO 1).

4.4 Análise Laboratorial das Amostras

4.4.1 Extração de DNA

A extração DNA das amostras biológicas (soro e coágulo) foi feita utilizando o kit comercial (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen®) em amostras sangue total, plasma, soro, coágulo ou outros fluidos corporais. Após a utilização de um tampão para lise, a amostra foi aplicada a uma coluna; que pela ação da força centrípeta possibilitou a extração do material genômico humano juntamente com o agente etiológico pesquisado.

O protocolo de extração de DNA de sangue ou fluido corporal para detecção de rickettsias segue abaixo:

- a) As amostras de soro foram colocadas à temperatura ambiente;
- b) Todos os reagentes utilizados foram separados e colocados em temperatura ambiente;
- c) O banho-maria foi programado para 56°C;
- d) Foram adicionados 200 µl de soro dentro do tubo de microcentrífuga de 1,5 ml ou o volume foi completado com PBS;
- e) Foram adicionados 20 µl de proteinase K (8mg/mL);
- f) Foram adicionados 200 µl de tampão AL ao tubo de microcentrífuga, misturados por vórtex durante 15 segundos e incubados, no Thermomix®, a 56°C para homogeneizar durante um período de 2 minutos com intervalos de 20 minutos;

- g) Após centrifugação rápida, foram adicionados 200 µl de etanol (96-100%) às amostras e a mistura foi homogeneizada por 15 segundos para em seguida, passar por uma nova centrifugação;
- h) A mistura foi aplicada à coluna QIAamp Spin e centrifugada a 8000 rpm por 1 minuto. O fluido do coletor foi desprezado;
- g) Foram aplicados 500 µl do tampão AW1 dentro da coluna. Foi novamente centrifugado a 8.000 rpm por um 1 minuto. Novamente o líquido filtrado foi descartado;
- h) Foram aplicados 500 µl do tampão AW2 dentro da coluna. Foi centrifugado a 14.000 rpm por 3 minutos, o produto foi desprezado e houve outra vez uma outra centrifugação a 14000 rpm durante 1 minuto. Novamente o líquido filtrado foi descartado e a coluna subsequentemente foi transferida para um microtubo de 1,5 ml;
- i) Foram adicionados 50µl de tampão de eluição AE. A amostra foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto. Repetiu-se este último passo (adição de AE, incubação e centrifugação).
- j) A coluna QIAamp Spin foi descartada e o produto da extração foi armazenado a uma temperatura de -20°C.

4.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foram testados quatro pares de oligonucleotídeos para detecção de rickettsias de grupo da febre maculosa (RGFM); estes pares amplificam diferentes regiões do genoma bacteriano como descrito mais detalhadamente a seguir.

4.4.2.1 Primer CS 406-427 F1/1270-1291 R1; rOmpA4940-4961F1/5690-5710R1

Para o primer CS esta amplificação in vitro foi realizada em um volume de 25 µl de reação que continha 2,5 µl de Tampão PCR 10X, 0,5 µl de cada primer 10 µM, 4 µl de MgCl₂ 25mM, 0,25 µl de quatro tipos de desoxinucleotídeos (20mM de cada

desoxinucleotídeo trifosfato), 0,2 µl de AmpliTaq *Gold*® DNA Polymerase (Invitrogen), 3 µL de DNA da amostra e água nuclease livre (Promega, Madison, WI, EUA). Já para o primer rOmpA, as quantidades de reagentes para a realização da PCR foram as mesmas utilizadas para o primer CS com exceção do cloreto de magnésio em que foram utilizados 3 µl de MgCl₂ 25mM.

Em seguida, para o primer CS, a reação de amplificação foi realizada em termociclador 9700 (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA) e consistiu de desnaturação inicial por 10 minutos a 95°C, seguida de 30 ciclos consecutivos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento a 55°C por 40s e extensão a 72°C durante 55s. Foi seguido por uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Para o primer rOmpA, a reação de amplificação foi realizada também em termociclador 9700 (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA) e consistiu de desnaturação inicial por 10 minutos a 95°C, seguida de 30 ciclos consecutivos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento a 62°C por 40s e extensão a 72°C durante 50s, seguido, no final, por uma extensão de 10 minutos a 72°C.

4.4.3 Nested PCR

4.4.3.1 Primer CS 494-515 F2/1045-1066 R2; rOmpA 4986-4961 F2/5418-5442R2

Para essa replicação *in vitro*, utilizado um volume de 25 µl de reação que continha 2,5 µl de Tampão PCR 10X, 0,5 µl de cada primer 10 µM, 3µl de MgCl₂ 25mM, 0,25 µl de quatro tipos de desoxinucleotídeos (20mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato), 0,2 µl de AmpliTaq *Gold*® DNA Polymerase (Invitrogen), 2 µL de DNA da amostra e água nuclease livre (Promega, Madison, WI, EUA). Já para o primer rOmpA, as quantidades de reagentes para a realização da PCR foram as mesmas utilizadas para o primer CS.

Em seguida, a reação de amplificação foi realizada em termociclador 9700 (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA) e consistiu de desnaturação inicial por 7 minutos a 95°C, seguida de 25 ciclos consecutivos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento a 63°C por 30s e extensão a 72°C durante 35s. Foi seguido por uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Para o primer rOmpA a reação de amplificação foi realizada

também em termociclador 9700 (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA) e consistiu de desnaturação inicial por 7 minutos a 95°C, seguida de 25 ciclos consecutivos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento a 55°C por 40s e extensão a 72°C durante 30s. Foi seguido por uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

As amostras foram testadas para a presença de DNA rickettsiano, utilizando oligonucleotídeos desenvolvidos pelo LHR (dados ainda não publicados) para os genes alvo *gltA* (*Rickettsia* sp.) e *rOmpA* (RGFM).

Quadro 4.1: Oligonucleotídeos (primers) utilizados para detecção das *Rickettsia* sp. em amostras de casos suspeitos de dengue, mas soronegativos no estado do Rio de Janeiro durante o período de janeiro de 2010 a junho de 2011.

Microrganismo	Oligonucleotídeos	Sequências (5' – 3')	Tamanho do fragmento
<i>Rickettsia</i> sp.	CS 406-427 F1	Dados ainda não publicados	885 pb
	CS 1270-1291 R1		
	CS 494-515 F2 ^b		572 pb
	CS 1045-1066 R2 ^b		

^b - *Nested* PCR

Quadro 4.2: Oligonucleotídeos (primers) utilizados para detecção da espécie *R. rickettsii* em amostras de casos suspeitos de dengue, mas soronegativos, no estado do Rio de Janeiro, durante o período de janeiro de 2010 a junho de 2011.

Microrganismo	Oligonucleotídeos	Sequências (5' – 3')	Tamanho do fragmento
Rickettsia do Grupo da Febre Maculosa	rOmpA 4940 – 4961 F1	Dados ainda não publicados	777 pb
	rOmpA 5690 – 5710 R1		
	rOmpA 4986 – 4961 F2 ^b		460 pb
	rOmpA 5418 – 5442 R2 ^b		

^b - *Nested* PCR

4.4.4 Eletroforese em Gel de Agarose

Para confirmar a amplificação, 10µl de cada produto de amplificação acrescido de 2µl de tampão da amostra (0,25% de bromofenol blue, 0,25% de xilenocianol e 30% de glicerol) foram separados em gel de agarose a 1,5% corado com solução de GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA).

A eletroforese foi realizada em tampão TBE 1X a 5V/cm. Os produtos de amplificação foram visualizados sob luz ultravioleta e registrados em sistema digital para documentação de gel (Carestream Gel Logic System).

Para permitir o cálculo do tamanho dos fragmentos foi utilizado o padrão de tamanho de DNA 100 pb DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em cada gel.

4.4.5 Sequenciamento

Os produtos amplificados no tamanho esperado a partir das amostras biológicas foram purificados utilizando-se o Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) de acordo com as instruções do fabricante, seguido de reação de sequenciamento no qual foi utilizado o kit Big Dye® Terminator TM v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) em um sequenciador automático (Applied Biosystems, modelo ABI PRISM 3130x, Foster City, CA, USA).

4.4.6 Análise das Sequências Genômicas

A análise do sequenciamento dos fragmentos de nucleotídeos e seus cromatogramas foram realizados através do Programa MEGA 5.0. (Tamura et al. 2011). Inicialmente as sequências foram analisadas contra o banco de dados público GenBank utilizando a ferramenta BLASTn. Em seguida, as sequências obtidas foram manipuladas no programa MEGA 5.0. Após a localização dos iniciadores, por meio dos quais o fragmento foi inicialmente amplificado, as sequências foram alinhadas entre si por meio da ferramenta MUSCLE (Edgar 2004) no programa MEGA 5.0. Uma sequência consenso foi estabelecida e as divergências de nucleotídeos entre as sequências foram esclarecidas pela análise dos cromatogramas de sequenciamento.

4.5 Análise Estatística

Os dados alimentados na planilha de Excel Microsoft Office XP foram analisados com base em estatísticas descritivas, sendo confeccionadas tabelas de frequências e gráficos. Para a variável idade foi calculado a média, mediana e o desvio-padrão. Para comparar proporções, foram determinados intervalos de confiança. Para testar a aderência entre o perfil da população total e a da população do estudo foram aplicados testes qui-quadrado com 95% de confiança.

5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

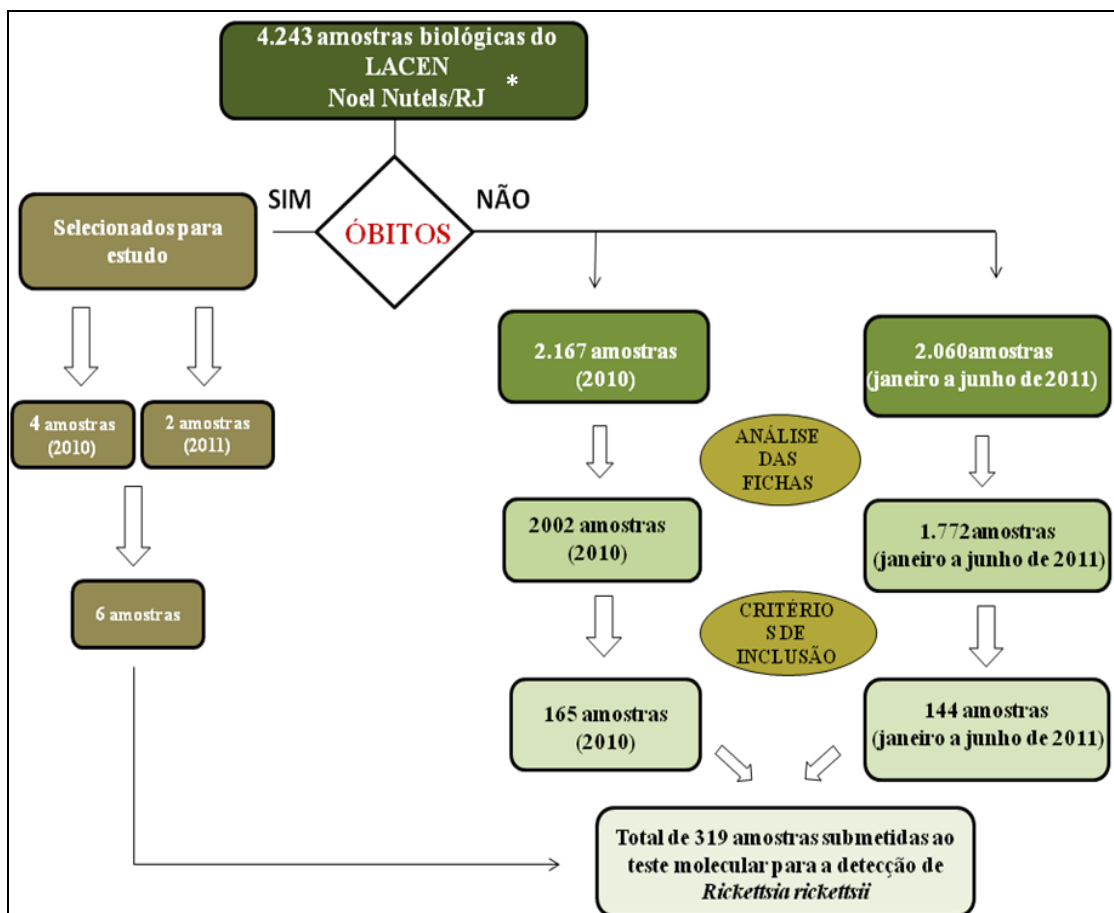
O estudo realizado se encontra inserido no projeto “Vigilância Epidemiológica de Hantavirose e Rickettsioses *lato sensu* dentro do Programa de Vigilância do Ministério da Saúde” e foi submetido ao Comitê Ético em Pesquisa (CEP) Fiocruz/IOC por se tratar de um estudo com seres humanos (nº do CEP 559/10) (ANEXO 2).

6. RESULTADOS

6.1 Características Clínicas e Epidemiológicas

Um total de 4.243 amostras biológicas constituído, predominantemente, por soros e coágulos, pertencentes a pacientes com suspeita de dengue, durante o período de janeiro de 2010 a junho de 2011, foi cedido pelo LACEN Noel Nutels/RJ ao LHR. Com a análise dos dados disponíveis nas fichas epidemiológicas, em 10 casos não foi possível identificar se o ano de ocorrência do caso clínico foi em 2010 ou 2011.

A Figura 6.1 apresenta o fluxograma dos resultados das etapas metodológicas utilizadas neste presente estudo. Deste total, 2.171 (50,10%) amostras foram de pacientes procedentes de 69/92 municípios durante o ano de 2010 (Figura 6.2) e 2.062 (47,59%) foram constituídas por amostras de pacientes provenientes de 61/92 municípios fluminenses durante o período de janeiro a junho de 2011 (Figura 6.3). É importante salientar que, em 62 (1,43%) fichas não foi possível a identificação dos municípios.



*10 casos não foi possível identificar se o ano de ocorrência foi em 2010 ou 2011.

Quatro (04) amostras procedentes de pacientes que evoluíram para óbito não foram processadas por falta de informações nas fichas epidemiológicas.

Em adição, 573 fichas, distribuídas durante o período de 2010 e 2011, não foram analisadas por não terem sido encontradas ou por apresentarem informações incompletas como (i) ausência de identificação do município de ocorrência de caso, (ii) falta de informações sobre o sexo e idade dos pacientes, (iii) inexistência da data de coleta ou data do início dos sintomas e (iv) inlegibilidade da letra na ficha epidemiológica.

No que se refere aos municípios, a análise dos dados possibilitou a identificação, no ano de 2010, de amostras procedentes de 69 municípios, com 220 amostras (10,13%) de Itaperuna, 215 amostras (9,9%) do Rio de Janeiro, 176 amostras (8,1%) de Nova Iguaçu, 154 amostras (7,09%) de Valença e 107 amostras (4,79%) de Paraty (Figura 6.2). Em 2011, durante o período de janeiro a junho, dos 61 municípios de onde procederam os casos suspeitos de dengue, sorologicamente negativos (IgM captura), o município do Rio de Janeiro foi o de maior representatividade, com 1.169 amostras (56,80%) do total (Figura 6.3).

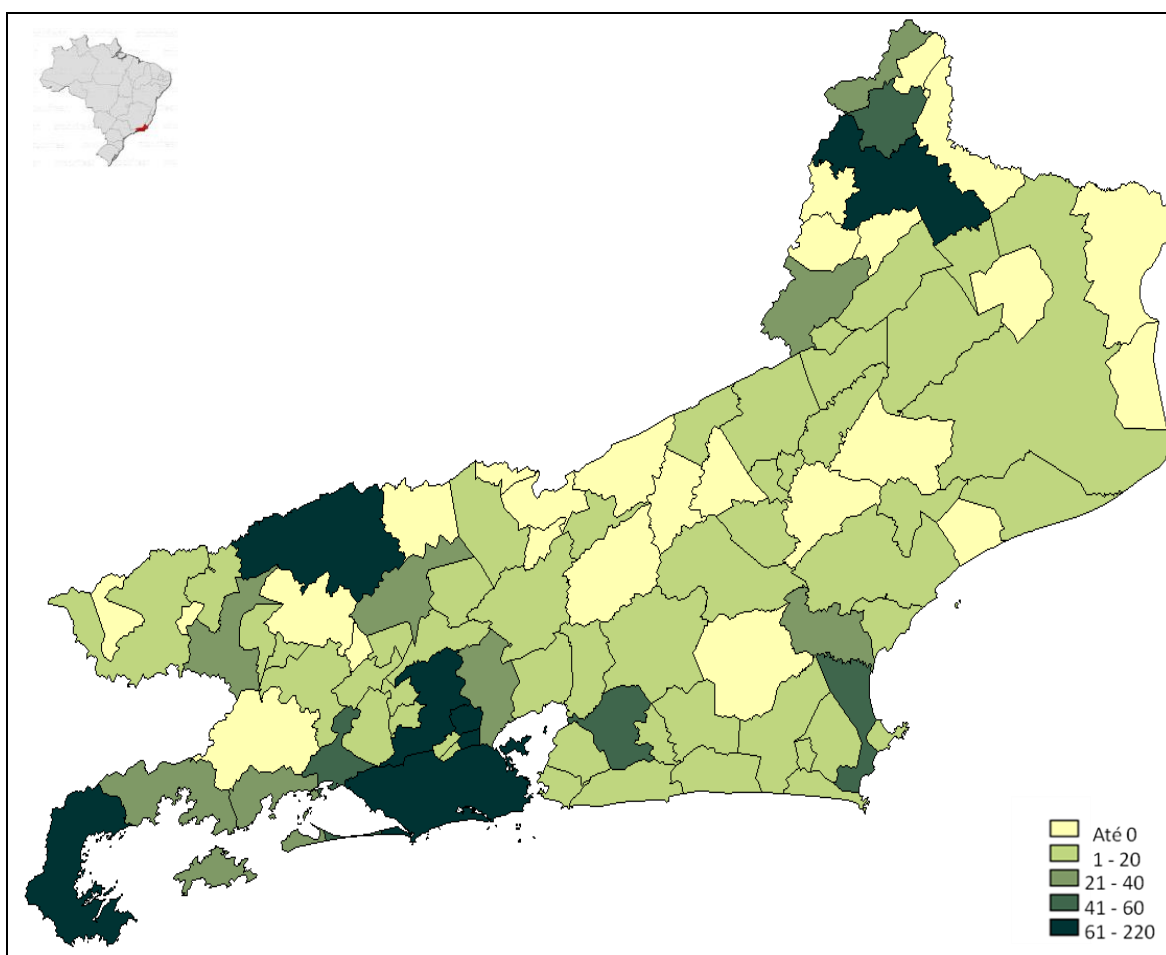


Figura 6.2: Quantitativo de amostras de casos suspeitos de dengue, sorologicamente negativos (IgM captura), segundo os municípios do estado do Rio de Janeiro, durante o ano de 2010.

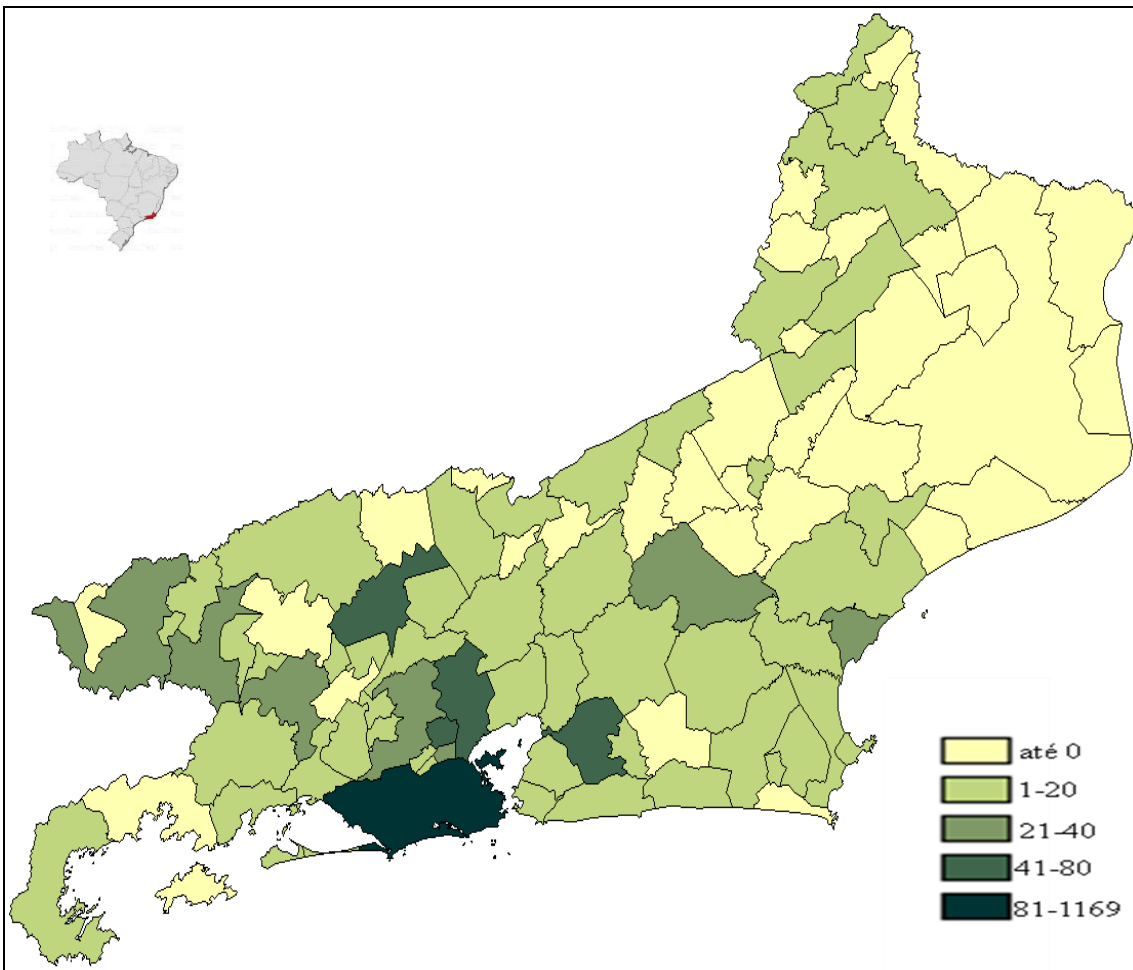


Figura 6.3: Quantitativo de amostras de casos suspeitos de dengue, sorologicamente negativos (IgM captura), segundo os municípios do estado do Rio de Janeiro, de janeiro a junho de 2011.

6.1.1 Perfil da População Total por Faixa Etária e Sexo para os Anos de 2010 e 2011

A análise do perfil da população total pode ser evidenciada através da tabela 6.1 com a descrição das variáveis, faixa etária e sexo, distribuídas no período analisado. Em relação à faixa etária, a maior concentração de casos suspeitos de dengue sorologicamente negativos foi observada entre os 20-29 anos seguida de 30-39 anos. Ainda em relação à idade, foi observada uma média de 30 anos com desvio padrão de 19 anos. O sexo feminino mostrou-se mais predominante, considerando tanto os períodos isoladamente, isto é, 2010 e

2011, quanto o período total, no qual 46,4% (1.966) eram pacientes do sexo feminino, e 39,9% (1.690) referentes ao sexo masculino (Tabela 6.1). A partir da faixa etária 20-29 anos, o sexo feminino prevalece na população total dos dois anos estudados (janeiro de 2010 a junho de 2011) e antes dessa faixa etária com exceção dos pacientes abaixo de 4 anos a população masculina prevalece na população total (Figura 6.4). É importante salientar que 13,6% das fichas (577) não apresentavam informação sobre a variável sexo.

Tabela 6.1: Perfil dos pacientes suspeitos de dengue sorologicamente negativos, no estado do Rio de Janeiro, por faixa etária e sexo, distribuído de janeiro de 2010 a junho de 2011.

Faixa Etária/ Sexo	2010				2011				2010 a 2011			
	Mas	Fem	Ign	Total	Mas	Fem	Ign	Total	Mas	Fem	Ign	Total
<1	8	9	-	17	12	19	-	31	20	28	-	48
1a4	35	30	-	65	35	43	-	78	70	73	-	143
5a9	64	68	-	132	75	65	-	140	139	133	-	272
10a14	96	100	-	196	137	115	-	252	233	215	-	448
15a19	95	81	-	176	91	85	-	176	186	166	-	352
20a29	165	171	-	336	137	173	-	310	302	344	-	646
30a39	138	172	1	311	100	145	-	245	238	317	1	556
40a49	90	129	-	219	84	118	-	202	174	247	-	421
50a59	62	101	-	163	57	106	-	163	119	207	-	326
60a69	42	50	-	92	36	46	-	82	78	96	-	174
70a79	20	22	-	42	20	20	-	40	40	42	-	82
80e+	10	13	-	23	4	6	-	10	14	19	-	33
Ign	24	25	350	399	53	54	226	333	77	79	576	732
Total	849	971	351	2171	841	995	226	2062	1690	1966	577	4233

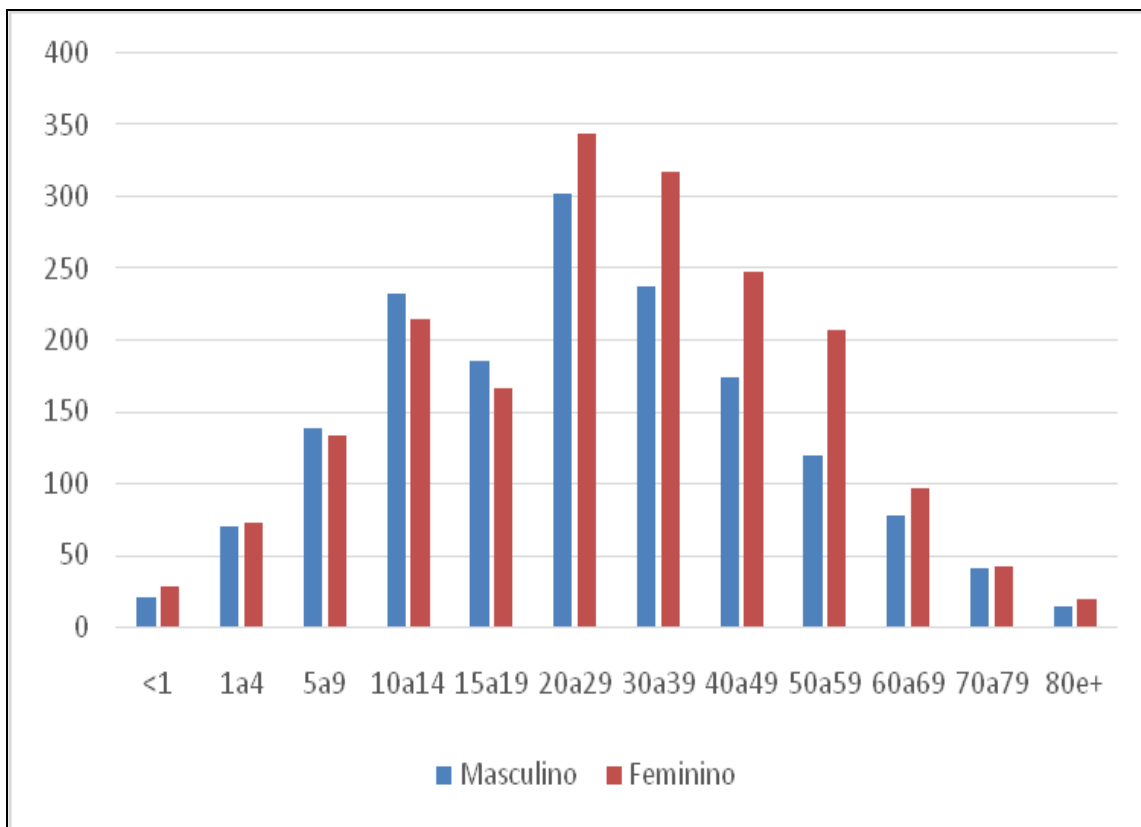


Figura 6.4: Distribuição dos casos suspeitos de dengue, sorologicamente negativos, segundo gênero e faixa etária, no estado do Rio de Janeiro (janeiro de 2010 a junho de 2011).

Após a avaliação da prevalência de manifestações clínicas na população geral em 2010 e 2011, observou-se que a febre predominou em 79,8% dos pacientes seguida de cefaleia (70,4%) e mialgia (54,5%). Dentre as manifestações hemorrágicas mais citadas foram a gengivorragia, melena e epistaxe. Outros sinais e sintomas menos frequentemente identificados, com menos de 4,4% de frequência foram choque, sufusão hemorrágica, icterícia, hepato/esplenomegalia, alterações respiratórias, hiperemia conjuntival, convulsão, necrose de extremidades, estupor, linfadenopatia, oligúria/anúria, artralgia e dor retro-orbitária, anorexia, prurido, astenia e adenomegalia.

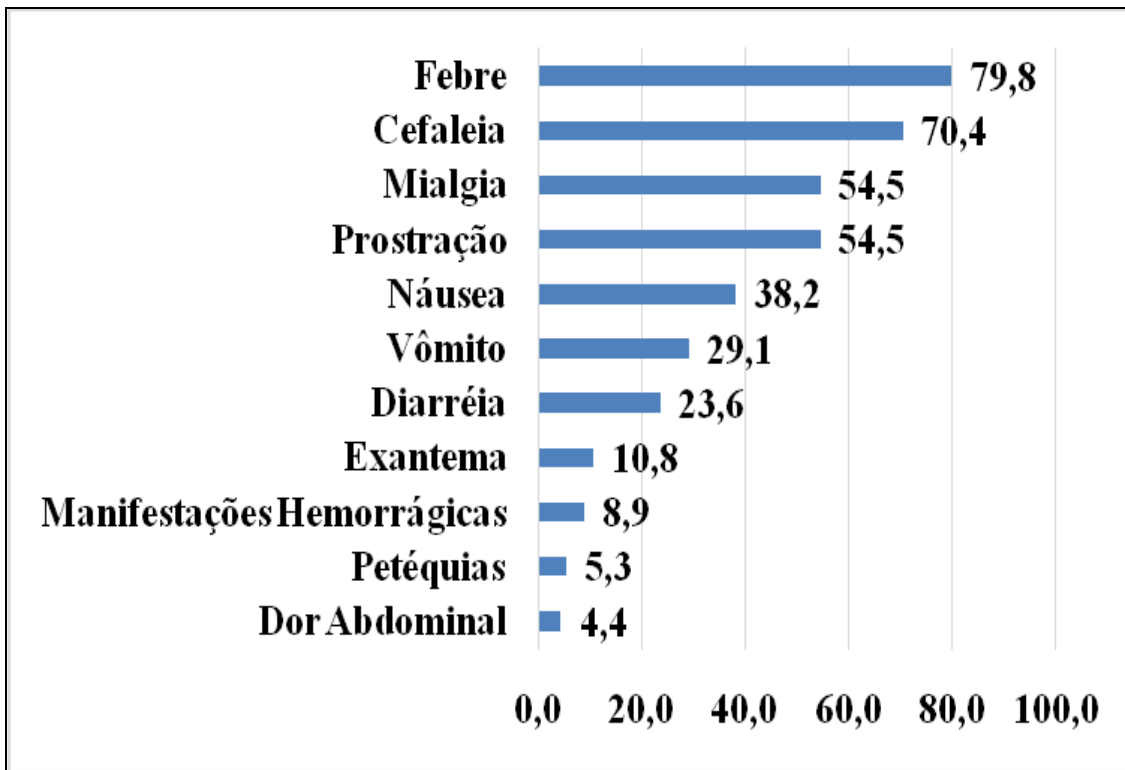


Figura 6.5: Frequência das manifestações clínicas dos casos suspeitos de dengue, sorologicamente negativos, no estado do Rio de Janeiro (janeiro de 2010 a junho de 2011).

Em relação à sazonalidade, a análise dos dados recuperados possibilitou identificar um maior número de amostras de casos suspeitos de dengue, sorologicamente negativos, no mês de abril, tanto em 2010 quanto 2011, com maior frequência de registros de casos no primeiro semestre (Figura 6.6).

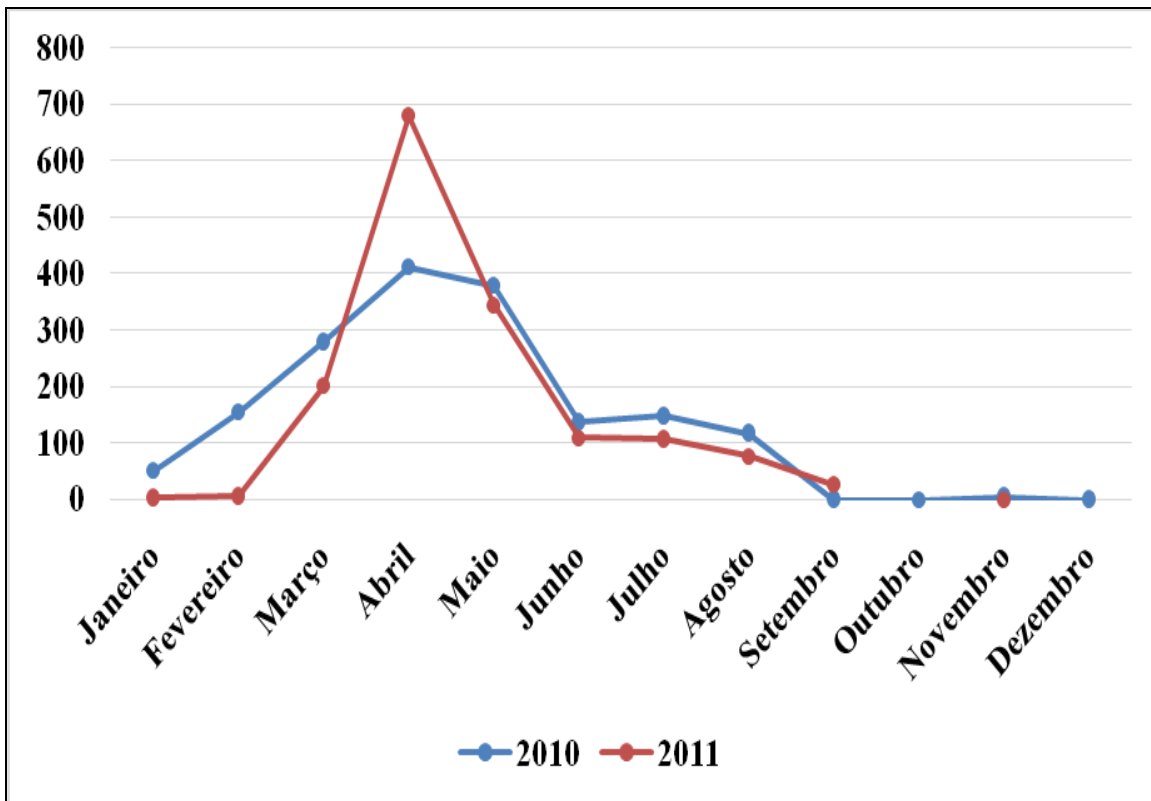


Figura 6.6: Distribuição mensal de casos suspeitos de dengue, sorologicamente negativos, no estado do Rio de Janeiro (janeiro de 2010 a junho de 2011).

6.2 População do Estudo após Aplicação dos Critérios de Inclusão

A partir da análise das fichas epidemiológicas, somente amostras provenientes de municípios com casos confirmados de FMB (Figura 6.7), que preenchessem os critérios de elegibilidade previamente estabelecidos ou casos fatais, mesmo em municípios sem relato de caso, foram incluídos no estudo.

Considerando a necessidade de redução de custos, já que a pesquisa de infecção por *R. rickettsii* foi realizada a partir da análise molecular, em uma primeira etapa de triagem, 319 amostras foram agrupadas em 65 pools, cada com cinco amostras e um pool contendo quatro amostras, após validação do procedimento. É imprescindível registrar que esta etapa de validação foi realizada previamente no LHR, onde soros sabidamente negativos para FMB, em volumes iguais, foram agrupados em pools de 3, 5, 10 e 15 amostras de soros,

com soro controle positivo para FMB. Em todos os quatro pools analisados foi possível detectar o DNA rickettsiano.

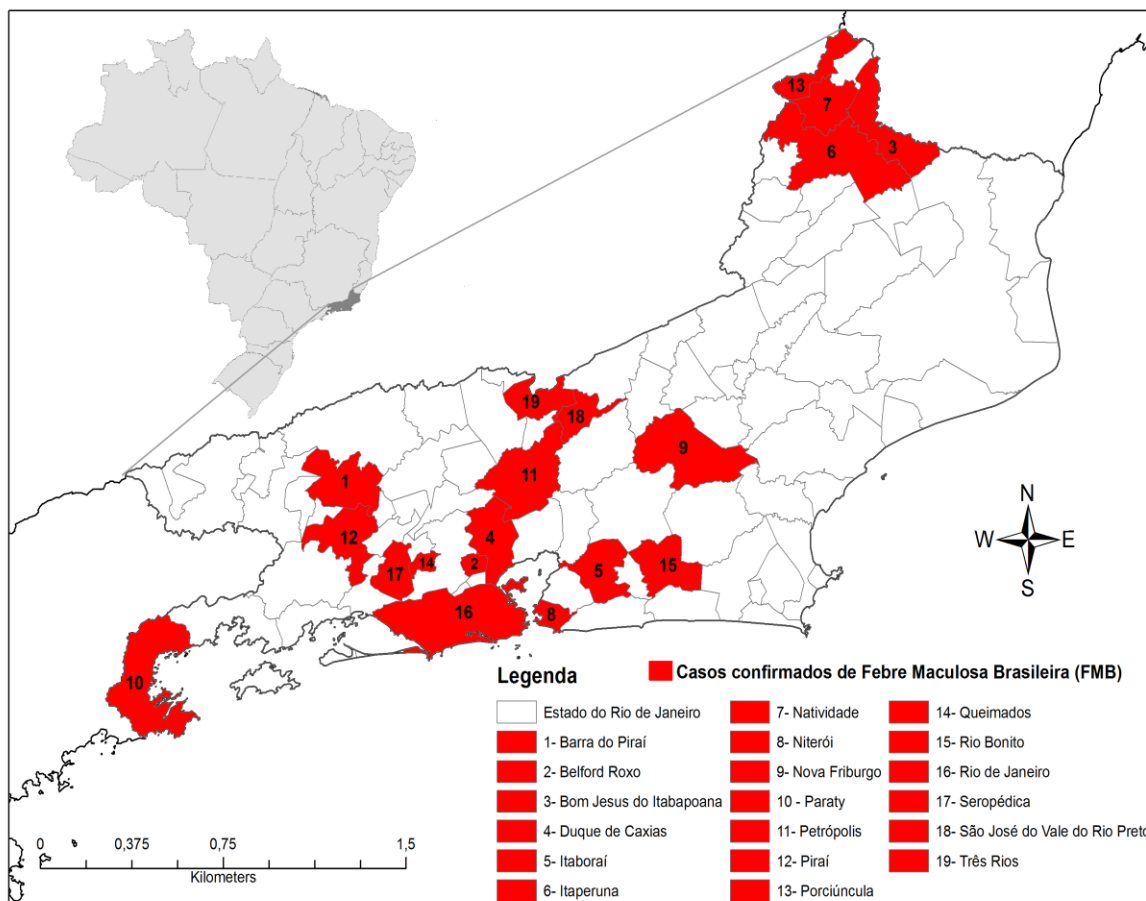


Figura 6.7: Municípios com casos confirmados de febre maculosa brasileira no estado do Rio de Janeiro durante o período de 2008-2012 (Dados cedidos pelo LHR).

Após o estabelecimento dos critérios de inclusão, 169 amostras de 2010, incluídas em 16 municípios, foram submetidas à pesquisa de infecção por *R. rickettsii*. Os municípios de Itaperuna (40,2%), Rio de Janeiro (16%) e Belford Roxo (12,4%) apresentaram o maior número de casos (Figura 6.8).

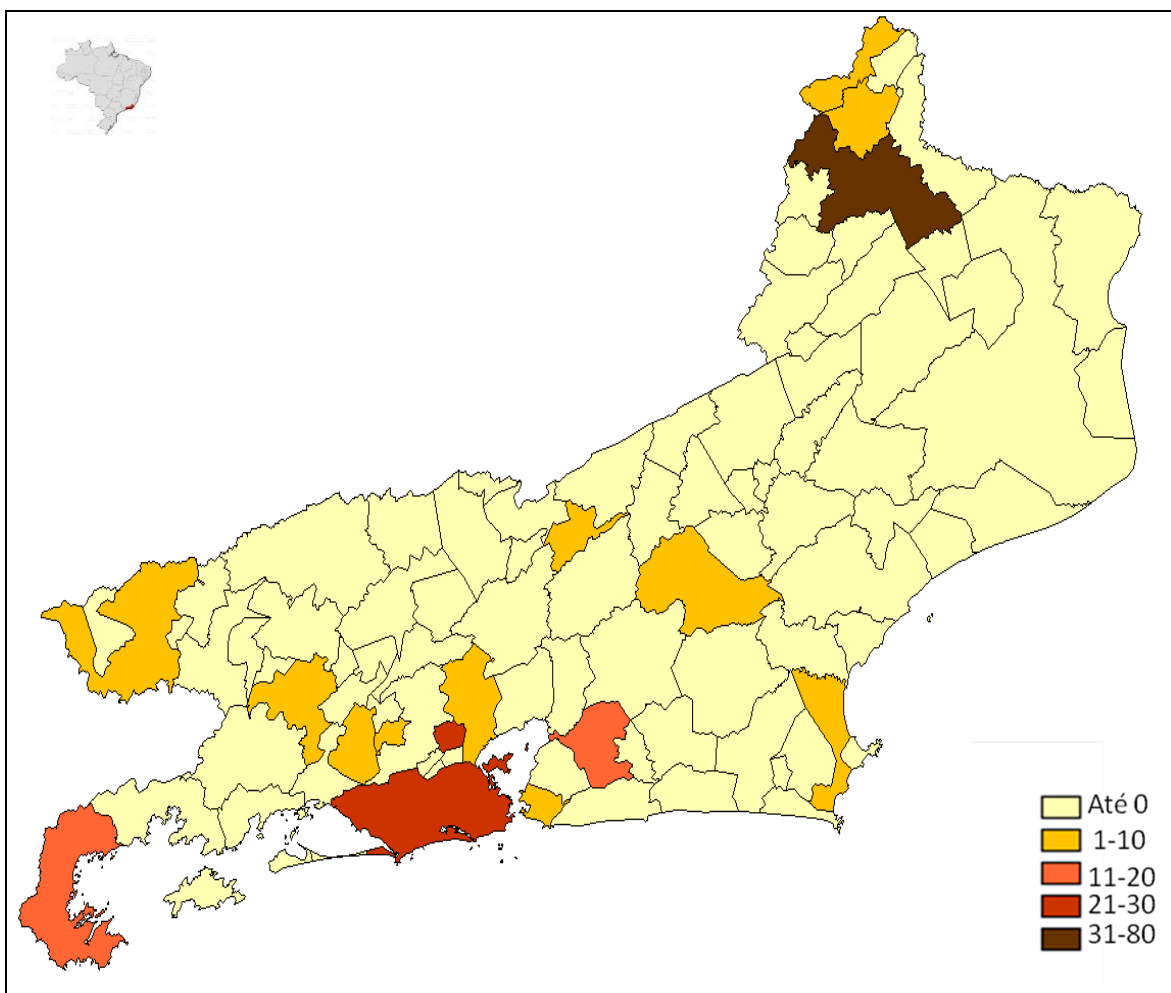


Figura 6.8: Quantitativo de casos suspeitos de dengue, sorologicamente negativos, após critério de inclusão, segundo os municípios no estado do Rio de Janeiro no ano de 2010.

No ano de 2011, de 150 pessoas, incluídas em 10 municípios, mais da metade (72%) residiam no município do Rio de Janeiro (Figura 6.9). Assim, em decorrência da restrição de insumos, especificamente nos município do Rio de Janeiro, somente bairros com casos confirmados de FMB e regiões circunvizinhas, como os bairros de Benfica e de Campo Grande e as regiões ao redor, foram incluídos no estudo.

valor=0,00526071638). Ao testar a aderência das distribuições por faixa etária nos dois anos e para cada um, separadamente, na população de estudo e comparando-as com as distribuições da população total, verificou-se a existência de diferenças significativas tanto para o ano de 2010 (p-valor de 0,0060844) e de 2011 (p-valor de 0,001090369), assim como para todo o período de janeiro de 2010 a junho de 2011 (p-valor de 0,0031373).

Analisando separadamente a variável sexo no ano de 2010, observou-se que a categoria masculina teve um total de 36,7% de amostras [IC 95%: 29%-44%] contra 63,3% do sexo feminino [IC 95%: 56-70%]. Já no ano de 2011, tanto sexo masculino quanto o feminino tiveram 49% do total de amostras [IC95%: 42,2%-55,8%]. Nesse mesmo ano, casos considerados ignorados corresponderam a 1,25% dos casos da população do estudo (Tabela 6.2).

Tabela 6.2: Perfil dos pacientes suspeitos de dengue sorologicamente negativos, após atendimento aos critérios de inclusão, no estado do Rio de Janeiro, por faixa etária e sexo, distribuído de janeiro de 2010 a junho de 2011.

Faixa Etária/Sexo	2010			2011				Total			
	Masc	Fem	Total	Masc	Fem	Ign	Total	Masc	Fem	Ign	Total
<1	1	2	3	-	-	-	-	1	2	-	3
1-4	2	1	3	1	1	-	2	3	2	-	6
5-9	8	9	17	3	1	-	4	11	10	-	21
10-14	7	15	22	14	9	-	23	21	24	-	45
15-19	3	12	15	7	8	-	15	10	20	-	30
20-29	10	23	33	18	12	-	30	28	35	-	63
30-39	18	21	39	9	9	-	18	27	30	-	57
40-49	4	15	19	8	15	-	23	12	30	-	42
50-59	5	7	12	5	15	-	20	10	22	-	32
60-69	1	2	3	3	2	-	5	4	4	-	8
70-79	2	-	2	1	1	-	2	3	1	-	4
80e+	1	-	1	3	1	-	4	4	1	-	5
Ignorado	-	-	-	-	-	4	4	-	-	4	4
Total	62	107	169	72	74	4	150	134	181	4	319

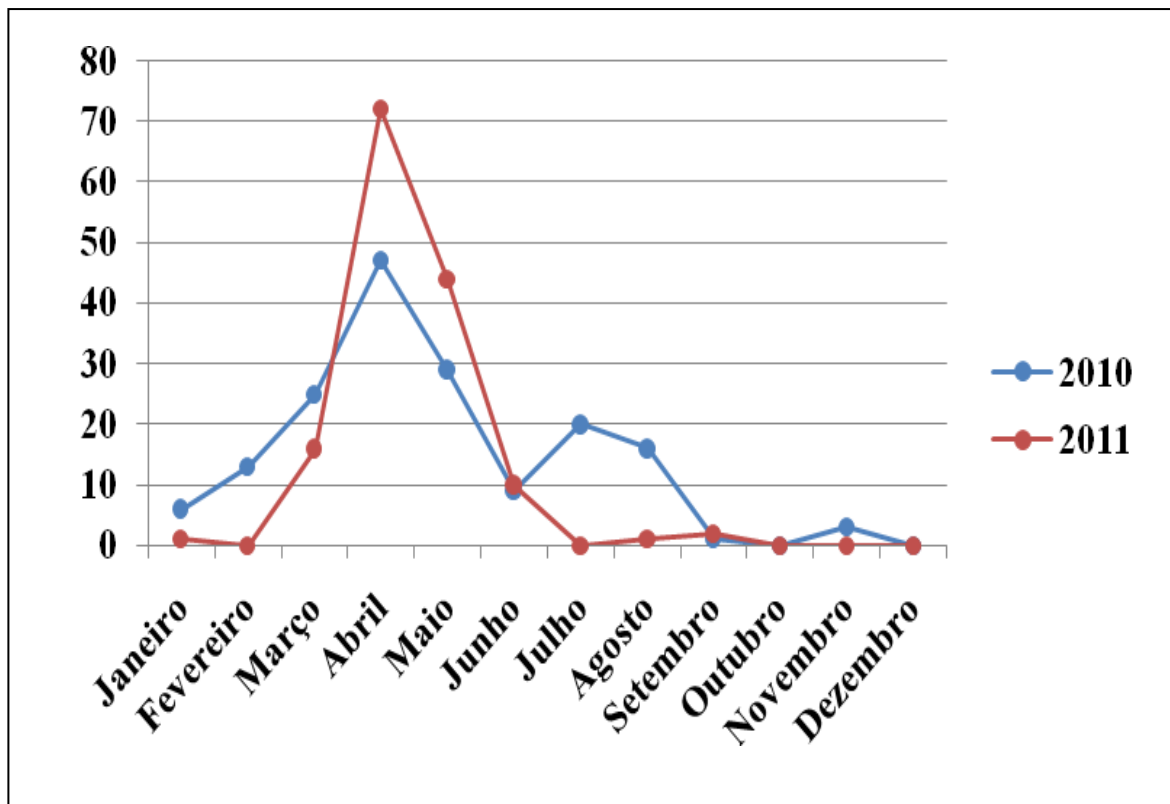


Figura 6.10: Distribuição mensal de casos suspeitos de dengue, sorologicamente negativos, após atendimento aos critérios de inclusão, no estado do Rio de Janeiro, no período de janeiro a junho de 2011.

No período total de estudo, de janeiro de 2010 a junho de 2011, no mês de abril foi registrado o maior número de amostras. Foi possível observar também que mesmo com a inclusão de casos restritos ao primeiro semestre de 2011, o número de casos registrados nesse mês superou ao do ano de 2010 (Figura 6.10).

6.3 Análise dos Casos Fatais

Do total de 10 óbitos encontrados, somente amostras de 6 casos previamente submetidas também, além do teste sorológico, à análise molecular para dengue e com fichas epidemiológicas, foram incluídas no estudo. Amostras de pacientes procedentes dos municípios de Valença, Itaperuna, Nova Iguaçu e Petrópolis não tinham em suas fichas, informações como data dos primeiros sintomas, data de coleta da amostra e manifestações clínicas (Tabela 6.3). Abaixo seguem sucintas informações que se encontravam disponíveis

nas fichas epidemiológicas dos seis casos fatais suspeitos de dengue, mas sem confirmação etiológica por teste sorológico e análise molecular. Todas as amostras de casos fatais foram submetidas, individualmente, à análise molecular para rickettsia.

Óbito 1: Paciente do sexo masculino, 34 anos, residente em Cabo Frio, com quadro agudo de febre, diarreia, manifestações hemorrágicas (gengivorragia e epistaxe) e choque;

Óbito 2: Paciente do sexo masculino, 6 anos, residente em Duque de Caxias, com quadro agudo febril associado com dor abdominal, vômito, exantema, diarreia, manifestações hemorrágicas e prostração;

Óbito3: Paciente do sexo feminino, 52 anos, residente em Resende, com síndrome febril aguda associada com cefaleia, mialgia, náusea, diarreia e prurido;

Óbito4: Paciente do sexo masculino, 64 anos, residente em Niterói, com história de febre, mialgia, hiperemia conjuntival, manifestações hemorrágicas, dor na panturrilha e insuficiência renal;

Óbito 5: Paciente do sexo feminino, 36 anos, residente no município de Seropédica atendida em emergência de hospital público, no mês de abril de 2011, com história de febre, mal-estar, cefaleia, mialgia, artralgia e dor retro-orbitária. Evoluiu com piora do quadro, com febre alta, desidratação, choque hipovolêmico que culminou com parada cardio-respiratória e óbito no sexto dia de doença.

Óbito 6: Paciente de 52 anos, sexo masculino, residente no município do Rio de Janeiro, procurou atendimento médico queixando-se de febre, cefaleia, mialgia, calafrios, dor na

panturrilha, náuseas, vômitos e diarreia. Com a suspeita diagnóstica de dengue ou leptospirose, o paciente foi tratado sintomaticamente e com 1.500.000 UI de penicilina cristalina aquosa G. Sua condição piorou, ele foi transferido para um hospital de referência mas 72 horas depois foi a óbito por falência múltipla dos órgãos. O soro do paciente foi coletado no quarto dia de doença e o diagnóstico para dengue e leptospirose foi negativo.

Tabela 6.3: Total de óbitos em casos suspeitos de dengue, sorológica e molecularmente negativos, no estado do Rio de Janeiro, durante o período de janeiro de 2010 a junho de 2011.

Municípios de residência	Ano de 2010	Ano de 2011	TOTAL
Cabo Frio	1	-	1
Duque de Caxias	1	-	1
Itaperuna*	-	1	1
Niterói	1	-	1
Nova Iguaçu*	-	1	1
Petrópolis*	-	1	1
Resende	1	-	1
Rio de Janeiro	-	1	1
Seropédica	-	1	1
Valença*	-	1	1
TOTAL	4	6	10

* Amostras biológicas cuja única informação era sobre o município de origem.

6.4 Resultado da Análise Molecular (PCR) para Febre Maculosa Brasileira

Duas das 319 amostras analisadas para a pesquisa de infecção por *R. rickettsii*, utilizando PCR, apresentaram DNA detectável (Figura 6.11). Estas amostras foram dos casos fatais 05 e 06, anteriormente descritos, que ocorreram no primeiro semestre do ano de 2011. Na amostra do caso 06, foi possível realizar o sequenciamento e os genes

apresentaram 100% de identidade com as sequências correspondentes dos genomas de *R. rickettsii* do Brasil (GenBank: CP003305).

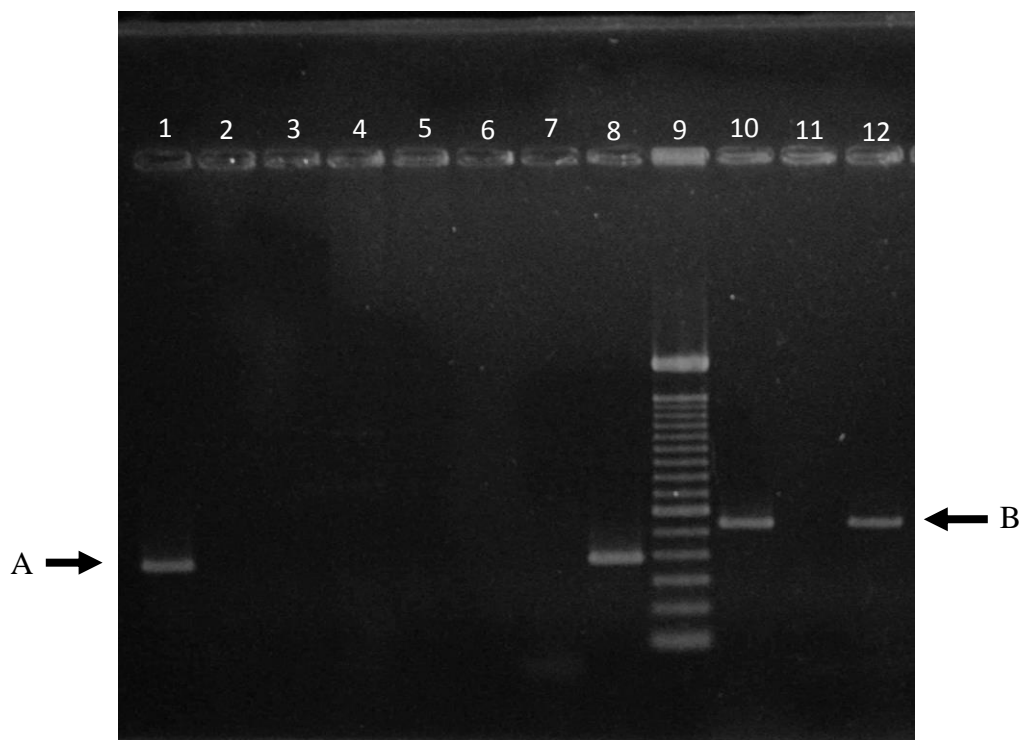


Figura 6.11: Eletroforese em gel de agarose de *Rickettsia* sp. e *R. rickettsii*, produto da reação em cadeia da polimerase amplificado a partir de DNA total de amostras do paciente 05 que evoluiu para óbito no sexto dia de doença febril aguda no estado do Rio de Janeiro (2011). Coluna 1-produto de DNA da amostra do paciente; coluna 7- controle negativo; coluna 8- controle positivo; coluna 9-marcador de peso molecular (100bp-DNA ladder); coluna 10-controle positivo; coluna 11- controle negativo; coluna 12-produto de DNA das amostras da paciente do caso 1. A seta A indica a amplificação do fragmento *gltA* de 381pb. A seta B indica a amplificação do fragmento *OmpA* de 532pb.

7. DISCUSSÃO

A FMB é considerada um agravo de baixa prevalência e incidência, porém, nas últimas décadas, o número de casos confirmados tem aumentado em todo o mundo, inclusive no Brasil. Em relação aos estudos no Rio de Janeiro, apesar de um histórico de aparecimento de casos desde a década de 1940, somente após a ocorrência do surto em Itaipava, Petrópolis, em 2005, a doença passou a ser considerada embora, ainda muito timidamente, como importante agravo no diagnóstico diferencial de casos febris no Rio de Janeiro (CDC 2010, Tostes & Bretz 1941, Lamas 2008, Lemos 2013).

Em relação à análise do perfil da população total, após a descrição das variáveis sexo e faixa etária, para o período de 2010 e 2011, bem como para cada ano, revelou que em casos febris agudos suspeitos de dengue, mas sem confirmação etiológica, a população adulta feminina procurou com mais frequência as unidades de saúde. Pela análise estatística percebeu-se diferença significativa entre as variáveis faixa etária e ano, ou seja, algum fator interferiu entre os dois anos estudados para que o perfil esperado não tivesse sido encontrado. É provável que este fator possa estar associado ao fato de que no período de janeiro a junho de 2011, os casos suspeitos de dengue foram predominantemente registrados no município do Rio de Janeiro, um período após epidemia de dengue ocorrido em 2010 (Silva et al. 2010).

Quanto aos critérios de inclusão estabelecidos, é imprescindível reforçar que o diagnóstico da febre maculosa com base no teste sorológico de imunofluorescência é retrospectivo e, assim, na ausência de amostras pareadas que pudessem ser analisadas sorologicamente, somente amostras coletadas com, no máximo, sete dias de doença, foram analisadas para pesquisa do genoma rickettsiano. Embora existam estudos com base no teste sorológico, a dificuldade de obtenção de uma segunda amostra em casos suspeitos de dengue limitam a sua utilização considerando que apenas 25% dos pacientes apresentam anticorpos detectáveis no sétimo dia de doença. Neste contexto, em trabalho publicado no XXV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Lemos e colaboradores reforçaram a necessidade do diagnóstico diferencial ao analisarem 232 de um total de 2.768

amostras de casos suspeitos de dengue laboratorialmente descartados pelo Laboratório de Referência Regional para Dengue do IOC/FIOCRUZ, referentes ao surto de 1995-1996. A partir da pesquisa de anticorpos em amostras dos casos caracterizados por febre, exantema e cefaleia, foi possível verificar evidência sorológica de infecção por leptospira, vírus da rubéola, vírus do sarampo e rickettsia do grupo da febre maculosa em 22, 04, 02 e 01 amostras, respectivamente (Lemos et al. 1999)

Curiosamente, no período de janeiro de 2010 a junho de 2011 foi possível observar que o maior número de amostras coletadas de casos suspeitos de dengue sem confirmação etiológica foi no mês de abril, fato que reforça a importância de se realizar o "diagnóstico de inclusão" da FMB diante os surtos de dengue, considerando a sazonalidade desta zoonose transmitida por carrapato que se inicia no mês de abril até outubro, na dependência, das condições climáticas e das espécies de carrapatos transmissores envolvidas. Um estudo realizado no Brasil demonstrou que a maioria dos casos ocorre durante o período de "carrapatagem", entre abril e outubro, quando as fases mais jovens do ciclo do carrapato - as larvas e as ninfas - predominam (Lemos et al. 1997b).

Pesquisas conduzidas pelo CDC, em 2010, mostraram que a maioria dos casos notificados de FMMR teve início durante os meses de verão com pico nos meses de junho e julho. Foi observado também que esta sazonalidade variou em diferentes regiões do país, como no Arizona, por exemplo, onde a transmissão associada com a espécie de carrapato *R. sanguineus*, os meses de pico de início da doença foram de abril a outubro, em concordância com os dados nacionais. (CDC 2010; Demma et al. 2006)

Em relação aos casos suspeitos de dengue, mas descartados por teste sorológico, que foram selecionados para a pesquisa de infecção por *R. rickettsii*, 40,2% dos casos foram procedentes do município de Itaperuna, onde nos últimos oito anos, frequentemente casos de FMB têm sido confirmados por teste sorológico e molecular. Assim, não é possível descartar a possibilidade de infecção por *R. rickettsii* em outras amostras que não tenham sido identificadas neste estudo devido (i) à exclusão de amostras que não atenderam aos critérios de elegibilidade, (ii) à impossibilidade de detecção de DNA rickettsiano

consequente à conservação inadequada das amostras, (iii) à restrição de insumos e (iv) à inexistência de amostras pareadas que pudessem ser analisada pelo teste de imunofluorescência indireta.

Da mesma forma é imprescindível discutir a possibilidade também, em decorrência do critério diagnóstico estabelecido para inclusão - teste sorológico IgM não reativo-, que algumas amostras soronegativas para dengue, hipoteticamente, se submetidas a outras técnicas diagnósticas, como isolamento viral, análise molecular (RT-PCR) e pesquisa de antígeno (NS1), poderiam confirmar infecção pelo vírus da dengue. Em adição, é preciso ressaltar que durante discussão do desenho de estudo pretendia-se incluir apenas amostras que fossem negativas para dengue, no mínimo, por duas técnicas diagnósticas (teste sorológico IgM + NS1 ou teste sorológico IgM + RT-PCR), critério que, se estabelecido, inviabilizaria o presente estudo, já que as amostras coletadas no ano de 2010 foram, submetidas, no LACEN Noel Nutels, apenas ao teste sorológico. Quanto à pesquisa de NS1, diante da informação de resultados falso negativos em amostras de casos causados pelo DENV-4 e de que as amostras nem sempre são submetidas à pesquisa de NS1, a decisão da inclusão de amostras soronegativas IgM para este estudo foi reforçada (Aryati et al. 2013)

Outra limitação foi a falta de dados clínico-epidemiológicos e laboratoriais nas fichas disponibilizadas pelo Lacen - Noel Nutels. Além de dados incompletos e informações imprecisas, fica evidente a dificuldade e até mesmo a impossibilidade de se realizar uma vigilância epidemiológica de agravos febris agudos a partir da utilização de amostras biológicas, especialmente durante surtos em decorrência do grande número de casos.

Neste estudo, foram avaliadas mais de quatro mil fichas epidemiológicas de casos suspeitos de dengue sem confirmação laboratorial, fato que aponta para a necessidade de um sistema de vigilância que permita a identificação de outros agentes que possam estar causando não somente surtos, mas casos graves e fatais, cujas manifestações clínicas possam se assemelhar ao quadro de dengue com ou sem complicações.

Assim, a ausência de informações e a dificuldade de extração dos dados contidos nas fichas, seja por preenchimento incompleto ou seja por problemas na caligrafia, limitaram o desenvolvimento do estudo que, essencialmente, se ressentiu por ter empregado dados previamente coletados por profissionais empenhados na assistência médica, sem interesse de pesquisa. Além dos escassos dados disponíveis nas fichas epidemiológicas, não raramente faltavam informações sobre a data de início de doença, tempo de doença, ou mesmo dados demográficos.

Em relação às manifestações clínicas, a febre maculosa apresenta um amplo espectro clínico e que por não serem específicas podem ser observadas em diversas doenças, em especial na dengue e na leptospirose, cujo diagnóstico diferencial com a FMB passa a ser um grande desafio para o clínico. Como na FMB o retardo no diagnóstico e tratamento específico pode levar ao óbito dentro de 7-10 dias, após o início dos sintomas, a inclusão de seu diagnóstico em casos febris com clínica e epidemiologia compatíveis deve ser sempre considerada.

Na análise molecular das 319 amostras que foram agrupadas em 76 pools, o DNA rickettsiano não foi detectado em nenhum pool. Somente dois casos fatais foram confirmados como FMB causados por *R. rickettsii*, um residente no município do Rio de Janeiro e outro no de Seropédica. Além do quadro clínico compatível com FMB os dois pacientes tinham uma história epidemiológica comum de contato com animais em uma instituição de abrigo de cães e gatos no município do Rio de Janeiro. Os casos fatais foram analisados separadamente. Este dado reforça a gravidade e o risco de morte com a infecção por *R. rickettsii*, cuja letalidade se encontra associada com o retardo no diagnóstico e no tratamento antimicrobiano específico com cloranfenicol ou doxiciclina e que não foram instituídos nos casos aqui descritos (Lemos, 2013).

Até a presente data apenas a espécie *R. rickettsii* tem sido identificada como agente causador da febre maculosa no território fluminense, embora mais recentemente uma nova espécie de rickettsia associada com *R. africae* e *R. sibirica* tenha sido associada com doença humana nos estados da Bahia e de São Paulo (Spolidorio et al. 2010 e Silva et al.

2011). Não obstante a presença de outra espécie de RGFV causadora de doença humana no Brasil, a possibilidade de infecção por rickettsia exótica não pode ser descartada. Assim neste contexto, tal como ocorrido em 2008 com um caso fatal causado por *R. conorii conorii* identificado em um paciente sul-africano, é imprescindível a caracterização molecular com o sequenciamento (Almeida et al. 2010).

Como ressaltado acima, quase que invariavelmente, a letalidade da FMB está associada com o retardo no diagnóstico e no tratamento, considerando não somente a dificuldade no diagnóstico diferencial, mas também o desconhecimento da FMB por parte de muitos profissionais da saúde que, em um período de epidemias de dengue, diagnosticam apenas e exclusivamente todos os quadros febris como dengue (Lemos, 2013; Silva et al. 2010). Os dois casos fatais de FMB identificados neste estudo confirmam esta premissa, já que ambos ocorreram no mês de abril, quando grande número de casos de dengue foram confirmados. Neste cenário, inquestionavelmente, a suspeita de dengue contribuiu para o agravamento do estado clínico e a evolução fatal dos dois pacientes por FMB.

Afora os dois casos de FMB identificados neste estudo, a partir da confirmação de mais três casos de óbitos por FMB, inicialmente também diagnosticados como dengue, foi possível identificar um surto, no qual cinco profissionais de uma sociedade protetora de animais (SUIPA) evoluíram para o óbito por FMB durante o período de 2011 e 2012. Estes três casos adicionais de FMB assim como os dois casos apresentados neste estudo foram causados pela espécie *R. rickettsii*. As amostras dos dois casos fatais do presente estudo foram submetidas também ao teste NS1 e RT-PCR para descartar o diagnóstico de dengue e os resultados foram negativos.

Quanto às manifestações clínicas apresentadas pelos dois casos com resultados positivos para PCR, merece destacar que, apesar da doença febril aguda associada com cefaleia, em nenhuma das fichas foi possível identificar a presença de exantema, fato que reforça a importância de não se excluir o diagnóstico de FMB na ausência de exantema. Embora a não identificação do exantema possa levar o profissional de saúde a não suspeitar

da FMB e priorizar diagnóstico e tratamento de outros agentes etiológicos que circulam na região ou que causem epidemias no momento, é preciso enfatizar que o exantema pode estar ausente: (i) em 15 a 20 % dos casos principalmente em indivíduos idosos, negros e com história de terapia específica precoce; (ii) em casos fulminantes com trombose sem inflamação perivascular e (iii) em mais de 80% dos casos fatais quando são vistos pela primeira vez pela assistência médica (Lemos 2013). Como nos dois casos houve suspeita inicial de dengue e o óbito ocorreu em menos de sete dias de doença é possível que se tratasse da forma fulminante, no qual o retardo terapêutico pode levar ao óbito, especialmente em indivíduos com história de alcoolismo e com deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD) .

Em nosso estudo, somente dois dos 10 óbitos computados (06 selecionados para análise molecular) tiveram o diagnóstico de FMB. Outros 08 casos ficaram sem a etiologia definida. Mello Jorge e colaboradores, em uma publicação de 2007, demonstraram que no território nacional, nos primeiros anos do século XXI, em média, 25% dos casos fatais permanecem sem etiologia definida (Figura 7.1)

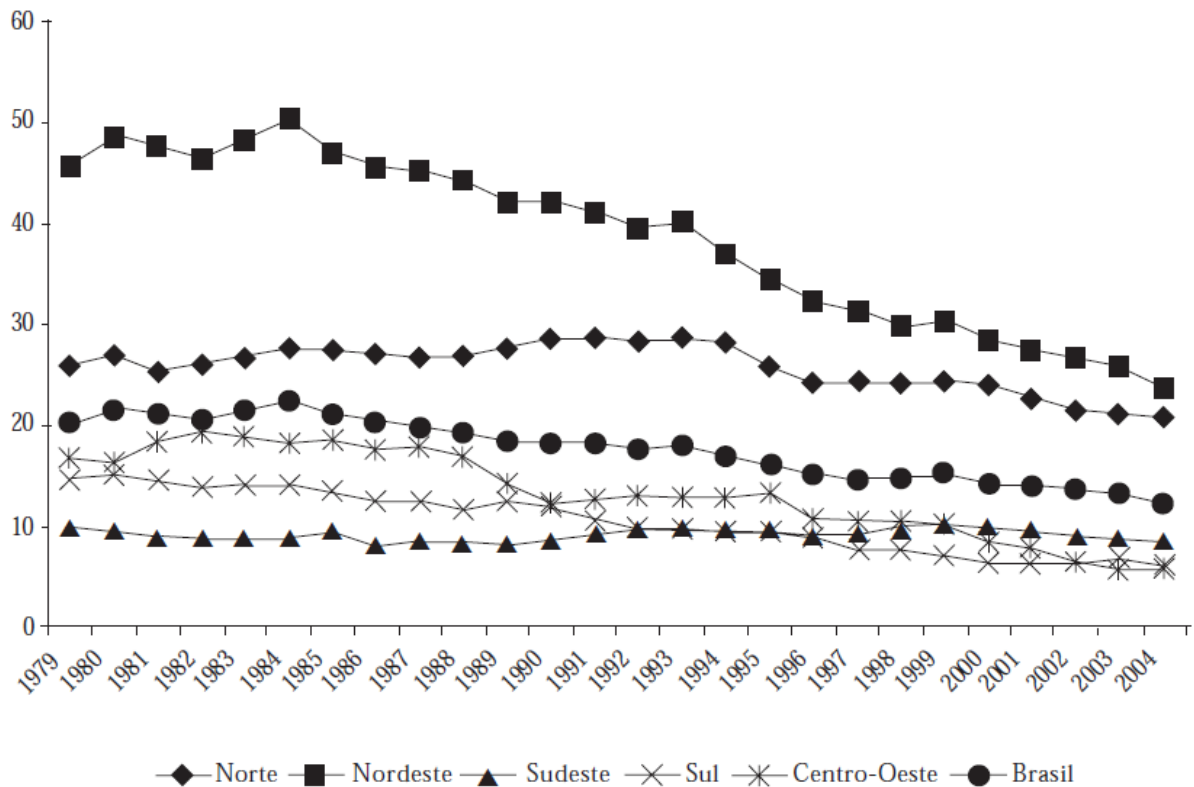


Figura 7.1: Proporção de óbitos (%) por causa não definida segundo ano do óbito e região, Brasil 1979 a 2004 (Mello Jorge et al. 2007).

Diante das inúmeras dificuldades encontradas no desenvolvimento deste estudo, é imprescindível atentar para a importância de se garantir a qualidade da informação na coleta de dados primários e de assegurar que o conjunto de instrumentos (fichas de notificação, por exemplo) seja totalmente preenchido e que os dados sejam seguramente registrados e armazenados, assim como as amostras biológicas, cuja importância deveria ser sempre considerada diante de casos sem etiologia definida, especialmente nos casos fatais. (Mota et al. 1999). Apesar de todo empenho em resgatar o maior número possível de amostra que pudesse ser analisada, neste trabalho, um total de 573 fichas (13,61%) foram inviabilizadas para o estudo.

Neste cenário e considerando o desenho de estudo retrospectivo com base em dados secundários e em amostras acondicionadas em laboratório de saúde pública, onde inexistia biobanco que preserve milhares de amostras soronegativas pós surto de dengue, é possível que outros casos de FMB não tenham sido identificados neste estudo, fato que não pode e não deve ser descartado.

Por fim, embora não tenha sido o objetivo deste estudo analisar o sistema de vigilância da dengue ou de qualquer outro agravo, o grande número de fichas que não pode ser analisado no trabalho constitui um forte indicativo da necessidade e da urgência em se traçar medidas que orientem a coleta e a organização dos diversos dados no campo da saúde pública, visando a uma vigilância epidemiológica mais robusta e eficaz assim como a instituição de medidas terapêuticas e preventivas adequadas em áreas onde, além das doenças endêmicas como dengue, leptospirose e malária, por exemplo, podem potencialmente ocorrer outros agravos, como a FMB, cuja letalidade dependerá do diagnóstico e tratamento precoces.

8. CONCLUSÕES

- A presença de DNA de rickettsia do grupo da febre maculosa foi identificada em amostras de soros de dois casos fatais, cuja suspeita clínica inicial foi de dengue no município do Rio de Janeiro, confirmando a hipótese inicial do estudo;
- Apesar da escassez de informações clínicas e epidemiológicas disponíveis nas fichas epidemiológicas, a maioria dos pacientes incluídos na pesquisa apresentava quadro clínico inespecífico caracterizado, por febre, cefaleia e mialgia, identificado tanto na febre maculosa quanto na dengue, dados concordantes com a literatura;
- A similaridade das manifestações clínicas da dengue com a febre maculosa e a ocorrência de surto de dengue durante o período de estudo contribuíram para o óbito dos dois casos de FMB, reforçando a necessidade da inclusão diagnóstica desta zoonose em casos febris agudos com história de contato com animais;
- Embora somente duas amostras tenham sido PCR positivas, não é possível descartar a possibilidade de outros casos de FMB, considerando o grande número de amostras que não puderam ser analisadas em decorrência da restrição de insumos e da inlegibilidade de muitas amostras;
- A análise do sequenciamento dos fragmentos de nucleotídeos obtidos em uma amostra fatal apresentou 100% de identidade com as sequências correspondentes dos genomas de *R. rickettsii* disponíveis no GenBank, confirmando a importância deste agente etiológico com a causa de óbitos no estado do Rio de Janeiro.

9. PERSPECTIVAS

- Redigir artigo com os resultados obtidos;
- Disponibilizar as informações obtidas neste estudo visando colaborar com a vigilância epidemiológica e com as medidas de prevenção das doenças infecciosas febris no estado do Rio de Janeiro;
- Continuar a realizar o diagnóstico diferencial da FMB em casos suspeitos de dengue no estado do Rio de Janeiro.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, DNP, Favacho AR, Rozental T, Barcaui H, Guterres A, Gomes R, Levis S, Coelho JMC, Chebabe A, Feijo P, Lemos, ERS 2010. Fatal Spotted Fever Group Rickettsiosis due to *Rickettsia conorii conorii* Mimicking a Hemorrhagic Viral Fever in a South African Traveler in Brazil. *Ticks Tick-borne Dis.* 1:149-150.

Aryati A, Trimarsanto H, Yohan B, Wardhani P, Fahri S, Sasmono RT 2013. Performance of Commercial Dengue NS1 ELISA and Molecular Analysis of NS1 Gene of Dengue Viruses Obtained During Surveillance in Indonesia. *BMC Infect Dis.* 13:611. doi: 10.1186/1471-2334-13-611.

Bäck AT e Lundkvist A 2013. Dengue Viruses—An Overview. *Infect Ecol Epidemiol* 3.

Brathwaite Dick O, San Martín JL, Montoya RH, del Diego J, Zambrano B, Dayan GH 2012. The History of Dengue Outbreaks in the Americas. *Am J Trop Med Hyg.* 87(4):584-593.

Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, Birtles RJ, Bjoersdorff A, Blanco JR, Caruso G, et al. 2004. Guidelines for the Diagnosis of Tick-Borne Bacterial Diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect.* (10): 1108-1132.

Buckingham SC, Marshall GS, Schutze GE, Woods CR, Jackson MA, Patterson LE, Jacobs RF, Tick-borne Infections in Children Study Group 2007. Clinical and Laboratory Features, Hospital Course, and Outcome of Rocky Mountain Spotted Fever in Children. *J Pediatr.* 150(2):180–184.

CDC 2006. Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases: Rocky Mountain Spotted Fever, Ehrlichioses and Anaplasmosis – United States. A Practical Guide for Physicians and Other Health Care and Public Health Professionals. v 55.

CDC 2010. Rocky Mountain Spotted Fever (RMSF). [Internet]. Acesso em: Janeiro, 2014. Disponível em:<http://www.cdc.gov/rmsf/stats>.

Chen LF, Sexton DJ 2008. What's new in Rocky Mountain Spotted Fever? *Infect Dis Clin North Am.* 22(3):415–432.

Chen R, Vasilakis N 2011. Dengue-Quo tu et quo Vadis? *Viruses.* (9):1562-608.

Chrispal A, Boorugu H, Gopinath KG, Chandy S, Prakash JA, Thomas EM, Abraham AM, Abraham OC, Thomas K 2010. Acute Undifferentiated Febrile Illness in Adult

Hospitalized Patients: The Disease Spectrum and Diagnostic Predictors – An Experience from a Tertiary Care Hospital in South India. *Trop Doct.* 40(4): 230-234.

Chungue E, Marché G, Plichart R, Boutin JP, Roux J. Comparison of Immunoglobulin G Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (IgG-ELISA) and Haemagglutination Inhibition (HI) Test for the Detection of Dengue Antibodies 1989. Prevalence of Dengue IgG-ELISA Antibodies in Tahiti. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 83(5):708-711.

Dalton MJ, Clarke MJ, Holman RC et al 1995. National Surveillance for Rocky Mountain Spotted Fever, 1981-1992: Epidemiological Summary and Evaluation of Risk Factor for Fatal Outcome. *Am J Trop Med Hyg.* 52: 405-413.

Davidkin I, Valle M, Peltola H, et al 1998. Etiology of Measles and Rubella-like Illnesses in Measles, Mumps, and Rubella-Vaccinated Children. *J Infect Dis.* 178:1567-1570.

De Moraes JC, Toscano CM, de Barros EN, Kemp B, Lievano F, Jacobson S, Afonso AM, Strebel PM, Cairns KL; VigiFex Group 2011. Etiologies of Rash and Fever Illnesses in Campinas, Brazil. *J Infect Dis* 204(suppl 2) S627-S636.

Del Fiol FS, Junqueira FM, Rocha MCP, Toledo MI, Barberato Filho S 2010. A Febre Maculosa no Brasil. *Rev Panam Salud Publica.* 27(6):461–466.

Demma LJ1, Traeger M, Blau D, Gordon R, Johnson B, Dickson J, Ethelbah R, Piontkowski S, Levy C, Nicholson WL, Duncan C, Heath K, Cheek J, Swerdlow DL, McQuiston JH 2006. Serologic Evidence for Exposure to *Rickettsia rickettsii* in eastern Arizona and Recent Emergence of Rocky Mountain Spotted Fever in this Region. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 6(4):423-429.

Dias E 1939. Depositários Naturais e Transmissores da Febre Maculosa Brasileira. *Brasil Med.* 52:269-272.

Dias E, Martins AV 1939. Spotted Fever in Brazil. A Summary. *Am J Trop Med.* 19: 103-108.

Dircio Montes Sergio A, González Figueroa E, María Saadia VG, Elizabeth SH, Beatriz RS, Altuzar Aguilar Víctor M, Navarrete Espinosa J 2012. Leptospirosis Prevalence in Patients with Initial Diagnosis of Dengue. *J Trop Med.*

Dos Santos FB, Nogueira FB, Castro MG, Nunes PCG, Filippis AMB, Faria NRC, Simões JB, Sampaio SA et al 2011. First Report of Multiple Lineages of Dengue Viruses Type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Virology* 8: 387.

Edgar RC 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32: 1792–1797.

Elisberg BL, Bozeman FM 1979. The Rickettsiae. In: Lerinete EH. Diagnostic Procedures. 5th edition. Washington: Am Publ Health Assoc. p.1061-1108.

Guedes E, Leite RC, Prata MC, Pacheco RC, Walker DH, Labruna MB 2005. Detection of *Rickettsia Rickettsii* in the Tick *Amblyomma cajennense* in a New Brazilian Spotted Fever-Endemic Area in the State of Minas Gerais. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100:841-845

Gomes L 1933. Typho Exantemático de São Paulo. Vírus Exantemático sob Condições Naturais, Isolado de Carrapato (*Amblyomma ovale koch*) Capturado em Cão de Zona Infectada. *Brasil Med.* 52:919-922.

Hall WC, Crowell TP, Watts DM, Barros VL, Kruger H, Pinheiro F, et al 1991. Demonstration of Yellow Fever and Dengue Antigens in Formalin-Fixed Paraffin-embedded Human Liver by Immunohistochemical Analysis. *Am J Trop Med Hyg.* 45(4):408-417.

Halstead SB 2009. Antibodies Determine Virulence in Dengue. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1171:E48-E56.

Hammon WM, Rudnick A, Sather GE 1960. Viruses Associated with Epidemic Hemorrhagic Fevers of the Philippines and Thailand. *Science.* 131(3407):1102-1103.

Helmick CG, Bernard KW, D'Aangelo LJ 1984. Rocky Mountain Spotted Fever: Clinical, Laboratory, and Epidemiological Features of 262 cases. *J Inf Dis.* v. 150, p. 480-488.

Horta MC, Labruna MB et al 2007. Rickettsia Infection in Five Area of the State of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 102: 793-801.

Igarashi A 1978. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* Cell Clone Sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol.* 40(3):531-544.

Kuno G, Gómez I, Gubler DJ 1987. Detecting Artificial Anti-Dengue IgM Immune Complexes Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Am J Trop Med Hyg.* 36(1):153-159.

Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Boyer DH, McBride JW, Pinter A et al 2004. Rickettsia Species Infecting *Amblyomma cooperi* Ticks from an Area in the state of São Paulo, Where Brazilian Spotted Fever is Endemic. *J Clin Microbiol.* 42: 90-98.

Lamas CC, Favacho A, Rozental T, Boia M, Kirsten A, Guterrez A, Barreira J, Lemos RS 2008. Characterization of *Rickettsia rickettsii* in a Case of Fatal Brazilian Spotted Fever in the City of Rio de Janeiro. *Braz J Infect Dis.* 12: 149-151.

Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV 1992. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol.* 30(3):545-551.

Leder K, Torresi J, Libman MD, Cramer JP, Castelli F, Schlagenhaut P, Wilder-Smith A, Wilson ME et al 2013. GeoSentinel Surveillance of Illness in Returned Travelers, 2007–2011. *Annals Int Med* 158(6): 456-468.

Lemos ERS 2009. Infecção por Rickettsias. In: Lopes AC, Duarte AJS, Souza Jr AL, Fontes B, Campos CAH, Sittart JAS (Org.). Tratado de Clínica Médica. 2ª ed. São Paulo: Roca Ltda. v.3, p.3900-3906.

Lemos ERS, Machado RD, Coura JR, Guimarães MA, Chagas N 1996. Epidemiological Aspects of the Brazilian Spotted fever: Serological Survey of Dogs and Horses in an Endemic Area in the State of São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 38(6): 427-430.

Lemos ERS, Machado RD, Pires FDA, Machado SL, Costa LMC, Coura JR 1997a. Rickettsiae-Infected Ticks in an Endemic Area of Spotted Fever in the State Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 93: 477-481.

Lemos ERS, Machado RD, Coura JR, Guimarães, MAA, Freire, NMS, Amorim M, Gazeta GS 1997b. Epidemiological Aspects of the Brazilian Spotted Fever: Seasonal Activity of Ticks Collected in an Endemic Area in São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 30(3): 181-185.

Lemos ERS, Nogueira RMR, Siqueira MAMT, Rozental T, Miogostovich MP, Cruz AS, Silva ED, Pereira MM 1999. Measles, Rubella, Spotted Fever Group Rickettsiosis and Leptospirosis in Patients with Clinical Diagnosis of Dengue in Rio de Janeiro, Brasil. Preliminary Results. In: XXV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Vitória/ES. *Soc Bras Med Trop.* 32: 467.

Lemos ERS, Alvarenga FF, Machado RD, Coura JR 2001. Rickettsial Spotted Fever in Brazil: A Seroepidemiological Study and Description of Clinical Cases in the State of São Paulo. *Am J Trop Med Hyg.* 65:329-334.

Lemos ERS, Rozental T, Villela CL 2002. Febre Maculosa Brasileira: Descrição de Um Caso Fatal no Estado do Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop.* 35(5):523-525.

- Lemos ERS 2013. Rickettsioses. In José Rodrigues Coura. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e parasitárias*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.1627-1645.
- Magalhães O, Rocha A 1942. Tifo Exantemático do Brasil. O Papel do Cão (*C. familiaris*) na Constituição dos Focos da Moléstia. *Brasil Med.* 30: 355-358.
- Magalhães O 1952. Contribuição ao Conhecimento das Doenças do Grupo Tifo Exantemático. In: Monografia 6. Rio de Janeiro. *Inst Osw Cruz*.
- Mahajan SK 2012. Rickettsial Diseases. *J Assoc Physicians India.* 60:37-44.
- Manock SR, Jacobsen KH, Bravo NB, Russell KL, Negrete M, Olson JG, Sanchez JL, Blair PJ, Smalligan RD, Quist BK, Espín JF, Espinoza WR, MacCormic FK, Fleming LC, Kochel T 2009. Etiology of Acute Undifferentiated Febrile Illness in the Amazon Basin of Ecuador. *Am J Trop Med Hyg.* 81(1): 146–151.
- McDade JE, Newhouse VF 1986. Natural History of *Rickettsia rickettsii*. *Ann Rev Microbiol.* 40: 287-309.
- Mello Jorge MHP, Laurenti R, Gotlieb SLD 2007. Análise da Qualidade das Estatísticas Vitais Brasileiras: A Experiência de Implantação do SIM e do SINASC. *Ciênc. saúde coletiva.* 12(3): 643-654.
- Melles HHB, Colombo S, Silva MV 1992. Febre Maculosa: Isolamento de *Rickettsia* em Amostra de Biópsia de Pele. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 34: 37-41.
- Melles HHB, Colombo S, Lemos ERS 1999. Isolamento de *Rickettsia* em Cultura de Células. *Rev Soc Bras Med Trop.* 32: 469-473.
- Miagostovich MP, Ramos RG, Nicol AF, Nogueira RM, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, et al. Retrospective Study on Dengue Fatal Cases 1997. *Clin Neuropathol.* 16(4):204-208.
- Miagostovich MP, Nogueira RM, dos Santos FB, Schatzmayr HG, Araújo ES, Vorndam V 1999. Evaluation of an IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Dengue Diagnosis. *J Clin Virol.* 14(3):183-189.
- Minninear TD, Buckingham SC 2009. Managing Rocky Mountain Spotted Fever. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 7(9):1131–1137.
- Mota E, Carvalho DM 1999. Sistemas de Informação em Saúde. In: Rouquayroi MZ. *Epidemiologia e Saúde.* 5ed. Rio de Janeiro: Medsi.
- Ministério da Saúde 2012. Saúde Brasil 2011. Uma análise da Situação de Saúde e a Vigilância da Saúde da Mulher. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_brasil_2011.pdf

Moliterno F 2009. Febre Maculosa Brasileira: Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Laboratoriais dos Casos Ocorridos no Estado do Rio de Janeiro no Período de Janeiro de 2004 a Dezembro de 2008. Rio de Janeiro. Mestrado [Dissertação em Medicina Tropical] - Instituto Oswaldo Cruz.

Monteiro J, Fonseca F, Prado A 1931. Pesquisas Epidemiológicas Sobre Thypho Exantemático de São Paulo. Possibilidade de Transmissão Experimental do Vírus por Ixodídeo. *Mem Inst Butantã*. 6:139-173.

Oliveira SA, Siqueira MM, Camacho LA, et al 2001. The Aetiology of Maculopapular Rash Diseases in Niteroi, State of Rio de Janeiro, Brazil: Implications for Measles Surveillance. *Epidemiol Infect*. 127:509-16.

Olson JG, McDade JE 1994. *Rickettsia* and *Coxiella*. In: Murray PR. Manual of Clinical Microbiology. 6th edition. Washington: ASM Press. P.678-684.

OMS 2009. Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. New ed. Geneva: World Health Organization.

PAHO. Alerta Epidemiológica: Dengue 21 de Junio 2013 [Internet]. Pan American Health Organization. 2013. [cited 2013]. Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22104&Itemid=

Paddock CD, Guerra MA, Childs JE 2008. *Rickettsia Rickettsii* (Rocky Mountain Spotted Fever). In: Long: Principles of Pediatric Infectious Disease. 3rd edition.

Papania M, Bromberg K, Grabowsky M, Bellini W, Stewart J, Erdman D 1994. Differential Diagnosis of Febrile Rash Illness in Children, Brooklyn. 1994. [abstract K748]. In: Program and Abstracts of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, DC: *Am Soc Microbiol*.

Parola P, Paddock CD, Raoult D 2005. Tick-borne Rickettsioses Around the World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts. *Clin Microbiol Rev*. 18: 719–756.

Pickering LK, Baker CJ, Long SS, McMillan JA 2006. Eds. Red Book: Report of the Committee on Infectious Diseases. 27th ed. Elk Grove, IL: American Academy of Pediatrics. 570-572p.

Piza JT, Gomes LS 1932. Typho Exanthematico de São Paulo. *Soc Imp Paulista*. 11-119.

Ramsay M, Reacher M, O'Flynn C, et al 2002. Causes of Morbilliform Rash in a Highly Immunised English Population. *Arch Dis Child*. 87:202-206.

Raoult D, Parola P 2007. *Rickettsial Disease*. Informa Healthcare. New York.

Renvoisé A, Mediannikov O, Raoult D 2009. Old and New Tick-Borne Rickettsioses. *Int Health*. 1: 17-25.

Richard, AL, 2012. Worldwide Detection and Identification of New and Old Rickettsiae and Rickettsial Diseases. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 64: 107–110.

Riley HD Jr 1981. Rickettsial Diseases and Rocky Mountain Spotted Fever-Part I. *Curr Probl Pediatr*. 11(5):1-46.

Rozental, T. Circulação de Rickettsias do Grupo da Febre Maculosa no Município de Barra do Piraí, Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2003. Dissertação de Mestrado. *Instituto Oswaldo Cruz*. Pós-Graduação em Biologia Parasitária.

Rozental T, Favacho AR, Barreira JD, Oliveira RC, Gomes R, Almeida DN, Lemos ER 2009. *Rickettsia* spp. Infection in *Rhipicephalus sanguineus* Ticks in a Brazilian Spotted Fever Endemic Rural Area in Rio de Janeiro State, Brazil. 2009. *Clin Microbiol Infect*. 15: 245-246.

Sabin AB 1952. Research on Dengue During World War II. *Am J Trop Med Hyg*. 1(1):30-50.

Sangioni LA et al 2005. Rickettsial Infection in Animals and Brazilian Spotted Fever Endemic City. *Emerg Infect Dis*. 11:265-270.

Shirley JA, Revill S, Cohen BJ, Buckley MM 1987. Serological Study of Rubella-Like Illnesses. *J Med Virol* 21:369-379.

Silva A, Evangelista MSN 2010. Syndromic Surveillance: Etiologic Study of Acute Febrile Illness in Dengue Suspicious Cases with Negative Serology. Brazil, Federal District, 2008. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 52(5): 237-242.

Silva Jr J 2013. DENGUE: Situação e perspectivas [Internet]. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. [cited 2013]. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2b_2013_abril.pdf.

Silva N, Eremeeva ME, Rozental T, Paddock CD, Favacho AR, Dasch G, Lemos, ERS, Ko A 2011. Eschar-Associated Spotted Fever Rickettsiosis, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 17(2): 275 - 278.

SINAN-Sistema de Informação de Agravos de Notificação 2013. Casos confirmados de Febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1997 a 2013. Disponível

em:http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Jun/24/CasosConfirmados_FebreMaculosa_97a2013.pdf

SINAN-Sistema de Informação de Agravos de Notificação 2013. Óbitos de Febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990-2013. Disponível em: http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Jun/24/obitos_FebreMaculosa_90a2013.pdf.

Spolidorio MG, Labruna MB, Mantovani E, Brandao PE, Richtzenhain LJ, Yoshinari NH 2010. Novel Spotted Fever Group Rickettsiosis, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 16: 521–523.

SVS/MS 2013. Situação Epidemiológica [Internet]. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. [Acesso em: Outubro 2013]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1525.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S 2011. Mega 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol.* (10): 2731-2739

Tostes J, Bretz G 1941. Sobre uma Rickettsiose Observada em Zona Rural do Estado do Rio de Janeiro. *Brasil Médico.*

Treadwell TA, Holman RC, Clarke MJ, Krebs JW, Paddock CD, Childs JE 2000. Rocky Mountain Spotted Fever in United States, 1993-1996. *Am J Trop Hig.* 63: 21-26.

Vasilakis N 2013. The Daemon in the Forest-Emergence of a New Dengue Serotype in Southeast Asia. 3rd International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever; Bangkok, Thailand.

Walker DH 2007. Rickettsiae and Rickettsial Infections: The Current State of Knowledge. *Clin Infect Dis.* 45 Suppl1: 39-44.

Walker DH, Bouyer DH 2003. *Rickettsia*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH et al. (ed.). Manual of Clinical Microbiology. Washington. ASM Press. p. 1005-1014.

Walker DH, Hawkins H, Hudson P. Fulminant Rocky Mountain Spotted Fever 1983. Its Pathologic Characteristics Associated with Glucose-6 Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Arch Pathol Lab Med.* 107: 121-125.

Walker DH, Ismail N 2008. Emerging and Re-Emerging Rickettsioses: Endothelial Cell Infection and Early Disease Events. *Nat Rev Microbiol* 6:375–386. doi: 10.1038/nrmicro1866.

Walker DH, Raoult D 2005. In: Mendel, Bennett & Dolin. Principales and Practices of Infections Diseases, 6th ed 2005. Chapter 184. *Rickettsia rickettsii* and Other Spotted Fever Group Rickettsiae (Rocky Mountain Spotted Fever and Other Spotted Fever).

Weiss E, Moulder JW 1984. The Rickettsias and Chlamydias. In: Krieg NR. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins. P.687-709.

Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich SYa, Horzinek MC, Igarashi A, Kääriäinen L, et al. 1985. Flaviviridae. *Interviol.* 24(4):183-192.

WHO 2009. Impact of Dengue [Internet]. World Health Organization. [Acesso em: Outubro 2013]. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/index.html>.

WHO 2013. Sustaining the Drive to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: Second WHO Report on Neglected Diseases. Geneva: World Health Organization.

Wood H, Artsob H 2012. Spotted Fever Group Rickettsiae: A Brief Review and a Canadian Perspective. *Zoonoses and Public Health.* 59 (Suppl. 2): 65–79.

Zavala-Velazquez JE, Yu XJ, Walter DH 1996. Unrecognized Spotted Fever Group Rickettsiosis Masquerading as Dengue Fever in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 55: 157-159.

11. ANEXO

11.1. Anexo 1

SINAN
SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO
FICHA DE INVESTIGAÇÃO **FEBRE MACULOSA**

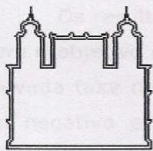
Nº

CASO SUSPEITO: Indivíduo que apresente febre, cefaléia, mialgia e história de picada de carrapatos e/ ou contato com animais domésticos e/ou silvestres e/ou tenha frequentado área sabidamente de transmissão de febre maculosa nos últimos 15 dias e/ ou apresente exantema máculo-papular ou manifestações hemorrágicas.

Dados Gerais	1 Tipo de Notificação 2 - Individual		3 Data da Notificação			
	2 Agravo/doença Febre Maculosa / Rickettsioses		Código (CID10) A 77.9	3 Data da Notificação		
	4 UF	5 Município de Notificação		Código (IBGE)		
	6 Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)		Código	7 Data dos Primeiros Sintomas		
Notificação Individual	8 Nome do Paciente		9 Data de Nascimento			
	10 (ou) Idade 1 - Hora 2 - Dia 3 - Mês 4 - Ano		11 Sexo M - Masculino F - Feminino 1 - Ignorado	12 Gestante 1-1º Trimestre 2-2º Trimestre 3-3º Trimestre 4- Idade gestacional Ignorada 5-Não 6- Não se aplica 9- Ignorado		13 Raça/Cor 1-Branca 2-Preta 3-Amarela 4-Parda 5-Indígena 9- Ignorado
	14 Escolaridade 0-Analfabeto 1-1ª a 4ª série incompleta do EF (antigo primário ou 1º grau) 2-4ª série completa do EF (antigo primário ou 1º grau) 3-5ª a 8ª série incompleta do EF (antigo ginásio ou 1º grau) 4-Ensino fundamental completo (antigo ginásio ou 1º grau) 5-Ensino médio incompleto (antigo colegial ou 2º grau) 6-Ensino médio completo (antigo colegial ou 2º grau) 7-Educação superior incompleta 8-Educação superior completa 9-Ignorado 10- Não se aplica					
	15 Número do Cartão SUS		16 Nome da mãe			
Dados de Residência	17 UF	18 Município de Residência		Código (IBGE)	19 Distrito	
	20 Bairro		21 Logradouro (rua, avenida,...)		Código	
	22 Número		23 Complemento (apto., casa, ...)		24 Geo campo 1	
	25 Geo campo 2		26 Ponto de Referência		27 CEP	
	28 (DDD) Telefone		29 Zona 1 - Urbana 2 - Rural 3 - Periurbana 9 - Ignorado		30 País (se residente fora do Brasil)	
	Dados Complementares do Caso					
Dados Clínicos	31 Data da Investigação		32 Ocupação			
	33 Sinais e Sintomas 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado					
<input type="checkbox"/> Febre <input type="checkbox"/> Cefaléia <input type="checkbox"/> Dor Abdominal <input type="checkbox"/> Mialgia <input type="checkbox"/> Náusea/Vômito <input type="checkbox"/> Exantema <input type="checkbox"/> Diarréia <input type="checkbox"/> Icterícia <input type="checkbox"/> Hiperemia Conjuntival <input type="checkbox"/> Hepatomegalia/Esplenomegalia <input type="checkbox"/> Petéquias <input type="checkbox"/> Manifestações hemorrágicas <input type="checkbox"/> Linfadenopatia <input type="checkbox"/> Convulsão <input type="checkbox"/> Necrose de extremidades <input type="checkbox"/> Prostração <input type="checkbox"/> Choque/Hipotensão <input type="checkbox"/> Estupor/Coma <input type="checkbox"/> Sufusão hemorrágica <input type="checkbox"/> Alterações Respiratórias <input type="checkbox"/> Oligúria/Anúria <input type="checkbox"/> Outros: _____						
Epidemiologia	Situação/exposição de risco nas últimas duas semanas (14 dias)					
	34 Teve contato com animais? 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado <input type="checkbox"/> Carrapato <input type="checkbox"/> Capivara <input type="checkbox"/> Cão/Gato <input type="checkbox"/> Bovinos <input type="checkbox"/> Equinos <input type="checkbox"/> Outros animais: _____					
35 Frequentou ambientes com mata, floresta, rios, cachoeiras, etc. <input type="checkbox"/>						
Tratamento	36 Ocorreu Hospitalização 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado		37 Data da Internação		38 Data da Alta	
	40 Município do Hospital		Código (IBGE)	41 Nome do Hospital		

Febre Maculosa Sinan NET SVS 19/09/2006

11.2 Anexo 2



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 29 de outubro de 2012.

PARECER: EMENDA APROVADA

Título do Projeto: *"Vigilância Epidemiológica de Hantavíroses e Rickettsioses Lato Sensu dentro do Programa de Vigilância do Ministério da Saúde".*

Protocolo CEP: 559/10

Pesquisador Responsável: Elba Regina Sampaio de Lemos

Instituição: Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses/IOC/Fiocruz

Foi submetido à apreciação do CEP Fiocruz/IOC e APROVADA a emenda ao protocolo supracitado visando à inclusão de amostras biológicas de pacientes, que se encontram armazenadas no Lacen Noel Nutels, coletadas durante o período de 2005 a 2010, para esclarecimento de doenças febris agudas. As amostras serão analisadas no Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses, uma vez que não tiveram diagnóstico fechado. As amostras serão recodificadas para garantir o anonimato e a confidencialidade dos sujeitos de pesquisa. Os resultados serão encaminhados para a SES/RJ com o objetivo de contribuir com a vigilância epidemiológica.

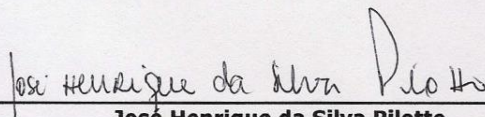
Considerando que as amostras a serem incluídas no estudo fazem parte de um material já coletado no contexto do programa de vigilância de doenças infecciosas do Ministério da Saúde, e que iriam ser desprezadas, pretende-se utilizar este material para o exercício do diagnóstico diferencial com zoonoses transmitidas por roedores (hantavíroses e arenavíroses) e por artrópodes (febre maculosa, febre Q, bartonelose, babesiose, borreliose), já que até a presente data, o diagnóstico etiológico se encontra indefinido.

Assim, a inclusão de material biológico coletado previamente nos anos anteriores ao início do projeto proposto (2011), por não apresentar um termo de consentimento livre e esclarecido, será realizada a partir da recodificação das amostras com a supressão da identidade, mantendo os dados demográficos, assim como as manifestações clínico-epidemiológicas, contidos no banco de dados do Lacen Noel Nutels.

Os resultados obtidos serão encaminhados para a Secretaria de Saúde do Rio de Janeiro com o objetivo de contribuir com a Secretaria de Vigilância Epidemiológica, considerando (i) a elevada taxa de casos febris suspeitos de dengue e leptospirose cujo diagnóstico laboratorial foi negativo e que ainda se encontram sem confirmação etiológica; (ii) surtos de febre maculosa em 2005 na região serrana e em 2011 no Rio de Janeiro, em uma instituição de abrigo de animais (SUIPA) onde cinco funcionários faleceram; (iii) a necessidade de vigilância de agentes zoonóticos causadores de rickettsioses e de roboviroses.

Diante do exposto, em sua 176ª Reunião Ordinária, realizada em 29.10.2012, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se por aprovar a emenda submetida para avaliação do CEP Fiocruz/IOC.

Informamos que deverão ser apresentados relatórios parciais e relatório final do projeto de pesquisa. Além disso, qualquer modificação ou emenda ao protocolo original deverá ser submetida para apreciação do CEP/Fiocruz.



José Henrique da Silva Pilotto
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
(CEP Fiocruz-IOC)

José Henrique da Silva Pilotto
Matrícula SIAPE 0627357
CRM 52.37829-7

INTEGRA O CEP FIOCRUZ-IOC OS SEGUINTE MEMBROS	
Parecer deliberado na 176ª reunião ordinária deste Comitê, realizada em 29.10.2012.	
Adalberto Rezende Santos - Membro	José Henrique da Silva Pilotto - Coordenador
Adriana Lima Vallochi - Membro	Kycia Maria Rodrigues Do Ó - Membro
Carlos Augusto Ferreira Andrade - Membro	Marcelle Coelho do Rosário - Membro
Carlos Norberto Varaldo - Rep. Usuários	Márcia de Cássia Cassimiro - Coordenadora Adjunta
Catarina Macedo Lopes - Membro	Marcos Adriano Lessa - Membro
Dumith Chequer Bou-Habib - Membro	Maria Regina Reis Amendoeira - Coordenadora Adjunta
Gerson Rosenberg - Membro	Vera Bongertz - Membro
	Yara Hahr Marques Hökerberg - Membro