UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Felipe Santos de Carvalho

Pesquisa de *Rickettsia* sp. em carrapatos e pacientes atendidos na região Ribeirão Preto, utilizando a PCR

NOVEMBRO DE 2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Pesquisa de *Rickettsia* sp. em carrapatos e pacientes atendidos na região Ribeirão Preto, utilizando a PCR

Tese de doutorado apresentada ao Programa
Pós-graduação em Clínica Médica
Da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,
Da Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Investigação Clínica

Aluno: Felipe Santos de Carvalho
Professor Orientador: Luiz Tadeu Moraes Figueiredo

NOVEMBRO DE 2021

Versão Corrigida

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO DE PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catalogação na Publicação

Serviço de Documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Carvalho, Felipe Santos de
Pesquisa de Rickettsia sp. em carrapatos e pacientes atendidos na região Ribeirão Preto, utilizando a PCR / Felipe Santos de Carvalho; orientador: Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo - Ribeirão Preto, 2021.
113p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado submetida à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica – Investigação Clínica, 2021.

1.*Rickettsia* 2.Febre Maculosa 3.PCR 4.Diagnóstico

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Janus

Universidade de São Paulo

ATA DE DEFESA

Ata de defesa de Tese do(a) Senhor(a) Felipe Santos de Carvalho no Programa: Medicina (Clínica Médica), do(a) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos 09 dias do mês de dezembro de 2021, no(a) FMRP-USP realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Felipe Santos de Carvalho, apresentada para a obtenção do título de Doutor intitulada:

"Pesquisa de Rickettsia sp. em pacientes e artrópodos de Ribeirão Preto utilizando a PCR"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Luiz Tadeu Moraes Figueiredo	Presidente	FMRP - USP	Não Votante
Benedito Antonio Lopes da Fonseca	Titular	FMRP - USP	APROVADO
Marcelo Bahia Labruna	Titular	FMVZ - USP	APROVADO
Rodrigo Nogueira Angerami	Titular	UNICAMP - Externo	APROVADO

Resultado Final: APROVADO

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Marcia Rita Pessini _____, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). Ribeirão Preto, aos 09 dias do mês de dezembro de 2021.

Benedito Antonio Lopes da Fonseca

Marcelo Bahia Labruna

Rodrigo Nogueira Angerami

Luiz Tadeu Moraes Figueiredo
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em _____ e, portanto, o(a) aluno(a) _____ jus ao título de Doutor em Ciências obtido no Programa Medicina (Clínica Médica) - Área de concentração: Clínica Médica - Opção:Investigação Clínica.

_____
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

DEVIDO À PANDEMIA DO COVID-19 E ÀS DIRETRIZES DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO E A CINC. COPGR. 12/2020 TODOS MEMBROS DA BANCA PARTICIPARAM DA DEFESA POR WEBCONFERÊNCIA E CONSIDERAM O ALUNO APROVADO.
9/12/2021

DEDICATÓRIA

A minha mãe, ***Daisy***, por ter sempre me incentivado e apoiado, sendo uma fonte inesgotável de inspiração, determinação, exemplo e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor ***Luiz Tadeu Moraes Figueiredo***, por ter aceitado o desafio de orientar este trabalho e por sua valorosa colaboração no seu desenvolvimento. Obrigado pela confiança em mim depositada;

À ***Soraya J. Badra***, pela amizade sincera e por todo o seu apoio, inclusive na coleta de carrapatos, junto com ***Rafael Cazarotti*** e ***Danilo Machado*** – a este e à ***Ana Beatriz dos Anjos***, minha profunda gratidão pela valiosa ajuda;

À ***Aline Tolardo***, ***Marília Farignoli*** e ***Larissa Bueno***, que me auxiliaram de maneira inestimável; e à toda equipe do laboratório, especialmente ***Angélica Silva***, ***Willian Marciel***, ***Leonardo La Serra***, ***Gilberto Jr***, ***Victória Thomazelli*** e ***Marcílio Jorge***;

Ao Professor ***Marcelo Bahia Labruna*** e toda a sua equipe, particularmente ***Jonas Filho***, ***Francisco Borges***, ***Amália Barbieri***, ***Carolina Serpa*** e ***Thiago Martins***, que despenderam seu tempo para contribuir com o meu treinamento;

A toda a equipe do Centro de Pesquisa em Virologia, em especial ***Adriana Ferreira***, ***Andreia Nogueira*** e ***Maria Lúcia Silva***;

Aos Professores ***Reynaldo Dietze***, ***Tânia Reuter***, **Roberto Martinez** e ***Benedito Fonseca***, infectologistas e docentes exemplares. Ao Professor Benedito, agradeço ainda por ter cedido amostras de soroteca para este estudo.

RESUMO

Carvalho, Felipe Santos de. **Pesquisa de *Rickettsia* sp. em carrapatos e pacientes atendidos na região Ribeirão Preto, utilizando a PCR**. 2021. 57 f. Tese de Doutorado em Clínica Médica – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2021.

Rickettsioses são zoonoses transmitidas por artrópodos, especialmente carrapatos, de distribuição ubíqua, sendo cada rickettsiose caracterizada por aspectos clínicos-epidemiológicos associados à espécie envolvida e a ecologia de seus vetores.

A Febre Maculosa Brasileira (FMB), principal rickettsiose no País, causada por *Rickettsia rickettsii* é considerada uma doença emergente e reemergente, que possui alta letalidade, apesar de ter boa resposta a antibioticoterapia de baixo custo. Estabelecer o diagnóstico precocemente é um desafio, pois não estão disponíveis testes diagnósticos rápidos e de alta acurácia. O presente estudo pesquisou DNA rickettsial por PCR, em pacientes e carrapatos na região de Ribeirão Preto/SP. Ao todo, foram analisadas 482 amostras, sendo 90 obtidas de 35 pacientes participantes; 255 amostras de banco de soro pacientes com síndrome febril aguda; 89 amostras de carrapatos representando 1633 animais, dos quais 978 coletados para o estudo (ninfas e larvas distribuídas em *pools* e adultos analisados individualmente), 654 de 19 *pools* previamente armazenados e um espécime encontrado em um paciente; e ainda 48 amostras de soro estocados de vertebrados. Em todas as amostras, foram usadas PCR's convencional em tempo real para o gene gltA. Os casos positivos foram avaliados por PCR's convencionais para fragmento maior de gltA, ompB e por *hemi-nested* para ompA. 4,1% das amostras foram positivas na PCR em tempo real, sendo duas amostras de pacientes participantes, duas de soroteca e 16 amostras de carrapatos capturados. Nenhuma amostra foi positiva com as técnicas convencionais para gltA e ompB. Uma amostra teve amplificação gênica no protocolo *hemi-nested* para ompA. O presente estudo confirmou a presença de rickettsia na região de Ribeirão Preto/SP por PCR. Técnicas moleculares podem ser úteis no diagnóstico e compreensão epidemiológica das rickettsioses.

Palavras-chave: 1.*Rickettsia* 2.Febre Maculosa 3.PCR 4.Diagnóstico

ABSTRACT

Carvalho, Felipe Santos de. **Survey for *Rickettsia* sp. in ticks and patients attended in the region of Ribeirao Preto, using PCR.** 2021. 57 f. Tese de Doutorado em Clínica Médica – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2021.

Rickettsial diseases are zoonosis transmitted by arthropods, especially ticks. They have a ubiquitous distribution and each rickettsiosis has a characteristic clinical and epidemiological pattern associated with its own rickettsial species and the ecology of its specific vectors.

Brazilian Spotted Fever (BSF), caused by *Rickettsia rickettsii* is the most important rickettsiosis in the country and is thought to be an emerging and reemerging disease. It is an acute febrile illness with high death rate, although it has a good response to low-cost antimicrobial therapy. One of the difficulties involving BSF is the lack of rapid diagnostic tests. A major challenge to physicians is to establish diagnosis as early as possible, allowing therapy to be started sooner, but fast and high accurate tests are not available. This study searched for rickettsial DNA using PCR in patients and ticks in the Ribeirão Preto region, state of São Paulo. 482 samples were analyzed: 90 samples from 35 patients enrolled in the study; 255 from sera bank of acute febrile patients; and 89 tick samples representing 1633 animals, of which 978 were collected for this study (nymphs and larvae in pools and adults individually), 654 from 19 pools previously stocked and one tick found feeding on a patient; and 48 serum samples previously obtained from wild vertebrate animals. Conventional and real time PCR targeting a gltA gene were performed in all samples. Positive cases were additionally analyzed by conventional PCRs for a long fragment of gltA, ompB and a hemi-nested protocol for ompA. 4.1% samples were positive by the real time PCR, two samples from enrolled patients, other two from sera bank and 16 samples from collected ticks. None of the samples were positive with conventional PCR for gltA or ompB genes. One sample were also positive with the hemi-nested PCR for ompA. This study has confirmed rickettsia in Ribeirão Preto region. Molecular methods can be useful for clinical diagnosis and epidemiological studies of rickettsiosis.

Keywords: 1.*Rickettsia* 2.Spotted Fever 3.PCR 4.Diagnosis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ciclo de vida das rickettsias transmitidas por carrapatos. 17
Figura 2: Distribuição de casos de FMB por sexo e faixa etária no estado de São Paulo (FONTE: SINAN). 26
Figura 3: Curso da infecção por rickettsias e métodos diagnósticos (FONTE: RICHARDS, 2012) 41
Figura 4: Imagens de coleta de carrapato no município de Ribeirão Preto. 48
Figura 5: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. Padronização de PCR convencional para *Rickettsia* sp. conforme técnica de extração. 52
Figura 6: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. Padronização de PCR convencional para *Rickettsia sp*. Concentração de primers 10 picomol/µl com diferentes temperaturas de anelamento 53
Figura 7: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. Padronização de PCR convencional para *Rickettsia* sp. Concentração de primers 20 picomol/µl com diferentes temperaturas de anelamento 53
Figura 8: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. Gel apresenta a titulação do controle positivo 54
Figura 9: PCR em tempo real para controle endógeno de amostras de pacientes... 61
Figura 10: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. Amostras de carrapato 62
Figura 11: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. Amostras de Cobaias 64
Figura 12: PCR em tempo real para pesquisa de DNA rickettsial em amostras de cobaias infectadas com *Rickettsia sp*. 64
Figura 13: Distribuição por sexo de 35 casos suspeitos de FMB. 66
Figura 14: Distribuição dos casos suspeitos de FMB por idade. 67
Figura 15: Distribuição sazonal de 35 casos suspeitos do FMB. 68
Figura 16: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. Gel apresenta amostras de pacientes com suspeita de FMB 71
Figura 17: PCR em tempo real para rickettsia em amostras de soro de pacientes. . 72
Figura 18: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. Amostras de soro de pacientes com síndrome febril aguda (soroteca). 74
Figura 19: Algumas características de identificação de carrapatos coletados 75
Figura 20: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. Amostras de carrapatos coletados para o estudo 76
Figura 21: PCR em tempo real para rickettsia em amostras de carrapatos e soro de animais. 77
Figura 22: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. Amostras de carrapatos *Rhipicephalus* coletados em Ribeirão Preto. 78
Figura 23: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. PCR convencional para *Rickettsia sp* realizada em carrapatos *Amblyomma sp*. coletados em Ribeirão Preto. 79
Figura 24: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. Gel em agarose a 1,5% de PCR convencional CS2 80
Figura 25: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. Gel em agarose a 1,5% de PCR convencional ompB 80
Figura 26: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. *Hemi-nested* para o gene ompA de amostras positivas no tempo real 80

Figura 27: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. Produtos positivos de PCR em tempo real de amostra de carrapatos e seres humanos.....81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Aspectos epidemiológicos das rickettsioses (FONTE: BLANTON, 2019). 18
Tabela 2: Casos confirmados autóctones e letalidade da FMB em SP, segundo o ano de início de sintomas (IS), de 2007 a 2019 (FONTE: SINAN). 25
Tabela 3: Quadro clínico das principais FM da América Latina (FONTE: ABARCA; OTEO, 2014) 33
Tabela 4: Amostras de 35 pacientes com suspeita clínica de FMB, no período de setembro de 2016 a junho de 2020. 45
Tabela 5: Espécies de 48 amostras de soro de animais coletados em Ribeirão Preto/SP entre 2012 e 2013. 50
Tabela 6: Lista de *primers* e sonda utilizados nos protocolos de PCR convencional e em tempo real, para detecção de *Rickettsia sp* e controles endógenos em amostras do estudo 62
Tabela 7: Ocupação dos 35 casos suspeitos de FMB..... 67
Tabela 8: Distribuição de Casos Suspeitos de FMB conforme naturalidade, residência e LPI. 68
Tabela 9: Exposição ambiental para 35 casos suspeitos de FMB 69
Tabela 10: Principais sintomas de 35 pacientes com suspeita de FMB..... 69
Tabela 11: Outras Manifestações clínicas de 35 pacientes suspeitos de FMB..... 69
Tabela 12: Comparação entre os resultados de PCR convencional e em tempo real de 35 pacientes com suspeita de FMB, com resultados do IAL/SP..... 73
Tabela 13: Diagnóstico final para os 35 casos suspeitos de FMB. 73
Tabela 14: Pesquisa de *Rickettsia* sp. em amostras estocadas de soro do CPV de 255 pacientes com síndrome febril aguda..... 75
Tabela 15: Identificação de 978 carrapatos coletados em Ribeirão Preto/SP..... 76
Tabela 16: Carrapatos do gênero *Rhipicephalus* capturados em Ribeirão Preto, SP. 77
Tabela 17: Carrapatos do gênero *Amblyomma* capturados em Ribeirão Preto, SP. 78

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP – adenosina trifosfato
BHQ1 – *Blackhole Quencher 1*
CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*
CPV – Centro de Pesquisa em Virologia
CS – Citrato Sintetase
DEBONEL – Linfadenopatia, Eritema e Necrose transmitida por *Dermacentor*
DDT – Diclorodifeniltricloretano
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EUA – Estados Unidos da América
FM – Febre Maculosa
FMB – Febre Maculosa Brasileira
FMM – Febre Maculosa Mediterrânica
FMMR – Febre Maculosa das Montanhas Rochosas
FMRP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FPCA – Febre por Picada do Carrapato Africano
GA – Grupo Ancentral Basal
GFM – Grupos das Febres Maculosas
GVE – Grupo de vigilância Epidemiológica
GT – Grupo do Tifo
GTr – Grupo de Transição
HC – Hospital das Clínicas
IAL/SP – Instituto Adolfo Lutz
IFI – Imunofluorescência Indireta
IFN – Interferon
Ig – imunoglobulina
LAR – Rickettsiose Associada à Linfangite (*Lynphangitis Associated Rickettsiosis*)
LAMP – Amplificação isotérmica mediada por loop
LPI – Local de provável infecção
NK – *Natural Killer*
OMP – proteína de membrana externa
OMS – Organização Mundial de Saúde
pb – Pares de Base
PBS – Tampão fosfato-salino (*Phosphate-buffered saline*)
PCR – Reação de amplificação em cadeia (polimerase chain reaction)
PI – Período de Incubação
RNA – Ácido ribonucleico
SARA – Síndrome da Angústia Respiratória Aguda
SENLAT – Linfadenopatia com Escara do Couro Cabeludo e do Pescoço
SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SP – São Paulo
TAE – tampão Tris-Acetato-EDTA
TIBOLA – Linfadenopatia Trasmitida por Carrapato (*Tick Born Lymphadenopathy*)
TH1 – T helper 1
TH2 – T helper 2
TNF – Fator de necrose tumoral
USP – Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14
1.1. Etiologia 14
1.2. Classificação 15
1.3. Distribuição Geográfica 16
1.4. Ciclo Vital e Transmissão 16
1.5. Epidemiologia 17
1.5.1. Epidemiologia das rickettsioses do GFM 18
1.5.2. Epidemiologia das Rickettsioses do GT 21
1.5.3. Epidemiologia das Rickettsioses do Grupo de Transição 23
1.6. Rickettsioses transmitidas por carrapato no Brasil 23
1.6.1. Distribuição dos casos de FMB no Brasil 24
1.6.2 Vetores e Reservatórios da FMB 26
1.7. Patogenia 29
1.8. Quadro Clínico das Rickettsioses 30
1.8.1. Manifestações Clínicas do GFM: 30
1.8.3. Manifestações Clínicas do GT 34
1.8.3. Manifestações Clínicas das Rickettsioses do Grupo de Transição 34
1.9. Diagnóstico das Rickettsioses 35
2. JUSTIFICATIVA 42
3. OBJETIVOS 43
4. MATERIAIS E MÉTODOS 44
4.1. Aspectos éticos 44
4.2. Seleção de pacientes 44
4.3. Comparação com testes realizados pelo IAL/SP 46
4.4 Amostras provenientes de Soroteca 46
4.5. Carrapatos 46
4.5.1. Carrapatos coletados: 47
4.5.2. Identificação dos carrapatos coletados 48
4.5.3. Carrapatos previamente estocados 49
4.5.4. Processamento dos carrapatos 49
4.6. Soro de animais vertebrados 49
4.7. Extração de DNA das amostras 50
4.8. Extração e padronização do controle positivo 51
4.9. Reações de amplificação gênica 54
4.9.1. PCR convencional (CS1) para *Rickettsia* sp 55

4.9.2. PCR em tempo real para *Rickettsia sp.* 56
4.9.3. Outras PCR's 57
4.9.4. Controle endógeno das amostras de pacientes 59
4.9.5. Controle endógeno de carrapatos 61
4.10. Sequenciamento de *amplicons* 63
4.11. Validação das PCR convencional CS1 e em tempo real 63
4.12. Medidas utilizadas para prevenir riscos no Projeto de Pesquisa 65
4.13. Análise dos resultados 65
5. RESULTADOS 66
5.1. Características epidemiológicas e clínicas dos 35 pacientes do estudo 66
5.2. Reações de amplificação gênica em amostras 71
5.3. Amostras dos pacientes participantes 71
5.4. Diagnóstico final dos participantes estudados 72
5.5. PCR das amostras de soroteca 74
5.6. Identificação de carrapatos coletados 75
5.7. PCR dos carrapatos identificados 76
5.8. Carrapatos estocados 77
5.9. Amostras de animais vertebrados 79
5.10. PCR adicionais 79
5.11. Sequenciamento das amostras positivas 81
6. DISCUSSÃO 83
6.1. Amostras humanas analisadas 84
6.2. Amostras de carrapatos e vertebrados 89
6.3. Análise das amostras positivas por PCR em tempo real 91
6.4. Perspectivas para o diagnóstico de rickettsioses no País 94
6.5. Possíveis contribuições deste estudo para Ribeirão Preto 96
7. Conclusões 99
8. REFERÊNCIAS 100
9. ANEXOS 106

1. INTRODUÇÃO

As rickettsioses são zoonoses de distribuição ubíqua, transmitidas aos seres humanos por artrópodos hematófagos, em especial carrapatos[1], mas também piolhos, pulgas e ácaros, e talvez mosquitos. Seu espectro clínico pode variar de quadros leves a graves, com padrões específicos de morbidade e mortalidade para cada rickettsiose. São de crescente interesse à saúde pública, pois se comportam em diversas regiões do mundo como doenças emergentes e reemergentes, ainda que seu diagnóstico seja negligenciado, uma vez que as manifestações clínicas das rickettsioses são indistintas de outras afecções febris agudas também endêmicas, que ocorrem notadamente nas regiões tropicais e subtropicais. Ainda, mesmo quando considerada sua hipótese, o diagnóstico é difícil, em razão da carência de métodos laboratoriais rápidos que possam ser feitos durante a atividade da doença. Em geral, a confirmação é estabelecida retrospectivamente, através, principalmente, da pesquisa de anticorpos (BLANTON, 2019; GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005; PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017; RICHARDS, 2012).

A suspeição dessas doenças em casos febris agudos é relevante, pois a instituição precoce de terapia adequada pode resultar em rápida melhora. Por outro lado, tratamento tardio está associado a pior prognóstico, baixa produtividade e custos elevados aos sistemas de saúde. Rickettsioses transmitidas por carrapatos podem causar doença grave e morte em pessoas hígidas, apesar da existência de antibióticos de baixo custo e eficácia comprovada (BLANTON, 2019; CHAPMAN; BAKKEN; FOLK; PADDOCK *et al.*, 2006; OTEO; NAVA; SOUSA; MATTAR *et al.*, 2014).

Nas últimas décadas, com o avanço nos métodos de diagnóstico e identificação, novas espécies de rickettsias têm sido associadas à doença humana e novas síndromes clínicas descritas (OTEO; PORTILLO, 2012).

1.1. Etiologia

Rickettsioses são causadas por várias espécies de bactérias do gênero *Rickettsia*, que juntamente com o gênero *Orientia*, pertencem à família *Rickettsiaceae*,

[1] Carrapatos são acarinos hematófagos obrigatórios presentes em quase todo o planeta, que parasitam todas as classes de vertebrados, inclusive, eventualmente, seres humanos, podendo transmitir zoonoses bacterianas (rickettsioses, borreliose, tularemia, Febre Q), virais e por protozoários. Em certas regiões, são os principais vetores de doenças. (PAROLA, 2004).

da subclasse α-1, ordem das *Rickettsiales*, do filo *Proteobacteria*. A primeira descrição desse gênero ocorreu em 1906, pelo patologista estadunidense Howard T. Ricketts. Desde então, este gênero tem se expandido, em especial nas últimas décadas em função da aplicação de métodos moleculares, contando com mais de 30 espécies (ABDAD; ABOU ABDALLAH; FOURNIER; STENOS *et al.*, 2018; EREMEEVA, 2012; GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005; PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017; STENOS; GRAVES; UNSWORTH, 2005).

Esse gênero é formado por pequenas bactérias (0,3 a 1,0 µm) pleomórficas, em geral cocobacilos ou bacilos curtos, desprovidas de motilidade. Sua parede celular é composta de peptidoglicanos e lipopolissacarídeos os quais conferem às rickettsias reação tintorial fracamente gram-negativa, sendo, porém, melhor distinguíveis pelas colorações de Gimenez, Giemsa e laranja de acridina. Seu genoma possui de 1,1 a 1,6 Mb. Por serem parasitas intracelulares obrigatórios, não proliferam em meios habituais de cultura bacteriana. Seu isolamento é possível apenas em animais de laboratório, ovos embrionários ou linhagens celulares especiais (DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010; OTEO; NAVA; SOUSA; MATTAR *et al.*, 2014; PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017).

1.2. Classificação

As espécies do gênero *Rickettsia* são historicamente divididas nos Grupos das Febres Maculosas (GFM) e Grupo do Tifo (GT), segundo características fisiológicas, localização dentro da célula hospedeira, temperatura de cultivo e padrão antigênico de reação cruzada a cepas de *Proteus* (ABDAD; ABOU ABDALLAH; FOURNIER; STENOS et al., 2018). Todavia, estudos genômicos resultaram em sua recategorização em quatro grupos (BLANTON, 2019; MANSUETO; VITALE; CASCIO; SEIDITA *et al.*, 2012; STENOS; GRAVES; UNSWORTH, 2005):

- Grupo Febre Maculosa: mais de 30 espécies, transmitidas principalmente por carrapatos duros (*Ixodidae*). Cerca 15 espécies são associadas à doença humana, entre as quais, as de maior patogenicidade, como *Rickettsia rickettsii, R. conorii, R. parkeri*, mas também *R. africae*, *R. sibirica* e *R. slovaca*;
- Grupo Tifo: *R. typhi e R. prowazekii,* transmitidas por pulgas e piolhos, respectivamente;

- Grupo de Transição (GTr): *R akari*, *R. australis* e *R. felis* (com características intermediárias entre o GFM e GT);
- Grupo Ancestral Basal (GA): *R. bellii* e *R. canadenses*. Até o momento, único grupo não associado à doença humana (BLANTON, 2019).

1.3. Distribuição Geográfica

Rickettsias são encontradas em todos os continentes, exceto na Antártica. A ocorrência de cada espécie é limitada pela distribuição de seus vetores e hospedeiros e por fatores climáticos. Algumas espécies têm distribuição universal, como *R. felis* e *R. typhi*, transmitidas por pulgas. Já a maioria das espécies é transmitida por carrapatos e sua distribuição associada à das espécies de carrapatos correlatas (ABDAD; ABOU ABDALLAH; FOURNIER; STENOS *et al.*, 2018; PAROLA, 2004).

1.4. Ciclo Vital e Transmissão

As rickettsias patogênicas circulam na natureza por meio de um ciclo zoonótico, no qual passam ao menos parte do seu ciclo vital num artrópodo, que atua como reservatório e/ou vetor, e pode envolver ainda hospedeiros vertebrados, os quais compreendem diversos mamíferos de pequeno e médio porte. (EREMEEVA; DASCH; SILVERMAN, 2003; PAROLA, 2004; STENOS; GRAVES; UNSWORTH, 2005).

A manutenção na natureza das rickettsias do GFM em carrapatos, se faz por transmissão transovariana (de uma fêmea infectada para seus ovos), por perpetuação transestadial (num mesmo carrapato, de um estágio para outro) e por transmissão horizontal para carrapatos não infectados que se alimentem de animais infectados na fase de rickettsemia. Carrapatos infectados podem transmitir então rickettsias a outros animais suscetíveis ou permanecerem infectados ao longo de sua vida, perpetuando a infecção por várias gerações (ABDAD; ABOU ABDALLAH; FOURNIER; STENOS *et al.*, 2018; DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010; WALKER; ISMAIL, 2008). Este ciclo está resumido na **Figura 1**.

A transmissão ao ser humano de rickettsioses do GFM por carrapatos ocorre pela pele, por intermédio da picada dos carrapatos infectados, durante sua alimentação, pois as bactérias são encontradas em suas glândulas salivares (DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010; PAROLA, 2004). O

mesmo padrão de transmissão é visto nas rickettsioses associadas a ácaros. Para as rickettsioses transmitidas por pulgas e piolhos (GT), a infecção humana se processa pelo contato de suas fezes no orifício da picada tegumentar ou membrana mucosa, mas também por inalação de partículas de poeira contaminada (RICHARDS, 2012).

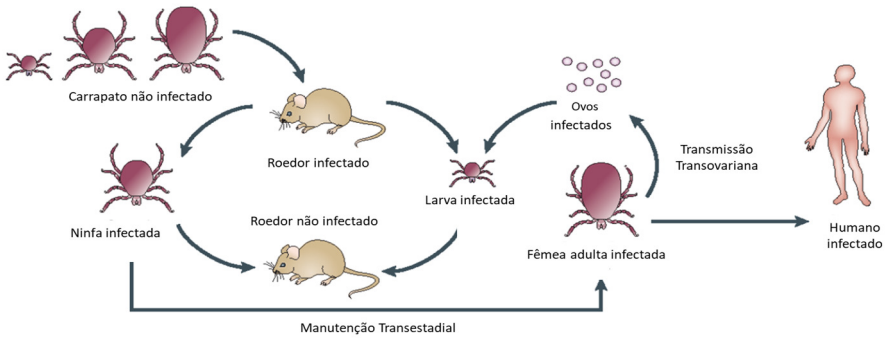

Figura 1: Ciclo de vida das rickettsias transmitidas por carrapatos.
Rickettsias são mantidas na natureza por transmissão transovariana, transestadial e horizontal. Fonte: WALKER e ISMAIL, 2008.

A prevalência de infecção rickettsial entre os vetores é variável e depende da capacidade de cada espécie vetora em adquirir a bactéria de um hospedeiro, mantê-la e passar a outros indivíduos da mesma espécie. Algumas rickettsias são patogênicas para seus vetores, como *R. rickettsii* para *Dermacentor* sp. Estima-se que somente um em cada 1000 espécimes de *Dermacentor* esteja infectado. Por conseguinte, é necessário que haja um reservatório amplificador para a sua manutenção na natureza. Por outro lado, algumas rickettsias são menos patogênicas para seus vetores, com transmissão transovariana eficiente, como *R. africae*, e assim têm maior prevalência nestes vetores (BLANTON, 2019; EREMEEVA, 2012).

O ser humano não faz parte do ciclo da maioria das rickettsias, sendo sua infecção acidental. No caso do GFM, a carrapatos em atividades ocupacionais ou recreativas. A infecção do ser humano representa ponto terminal no ciclo rickettsial, exceto no tifo epidêmico, no qual atua como reservatório (BLANTON, 2019; GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013).

1.5. Epidemiologia

A ocorrência de rickettsioses resulta da interação entre o ser humano com vetores e animais hospedeiros, a qual sofre a influência da localização geográfica, de questões ambientais, culturais e socioeconômicas (ABARCA; OTEO, 2014).

Rickettsioses continuam a emergir e reemergir em diversas regiões, em especial com o aumento da mobilidade internacional. Por exemplo, há registros de Febre por Picada do Carrapato Africano (FPCA) em viajantes que retornam da África subsaariana e o tifo murino tem sido descrito em europeus que visitam o sudeste asiático ou os Estados Unidos da América (EUA) (BLANTON, 2019; PAROLA, 2004).

Aspectos das diversas rickettsioses estão na **tabela 1**, correlacionando seus agentes etiológicos e grupos, sua distribuição geográfica, vetores e gravidade.

Tabela 1: Aspectos epidemiológicos das rickettsioses (FONTE: BLANTON, 2019).

Table 1
Epidemiologic features of rickettsial diseases

Disease	Organism	Group	Distribution	Vector	Severity
Rocky Mountain spotted fever	*R rickettsii*	Spotted fever	Americas	Tick	+++++
Mediterranean spotted fever	*Rickettsia conorii*	Spotted fever	Europe, Africa, Asia	Tick	+++
Siberian tick typhus	*Rickettsia sibirica*	Spotted fever	Eurasia, Africa	Tick	++
Japanese spotted fever	*Rickettsia japonica*	Spotted fever	Japan, eastern Asia	Tick	++
Flinders Island spotted fever	*Rickettsia honei*	Spotted fever	Australia, Asia	Tick	++
Far Eastern spotted fever	*Rickettsia heilongjiangensis*	Spotted fever	Eastern Asia	Tick	++
African tick bite fever	*Rickettsia africae*	Spotted fever	Sub-Saharan Africa, Caribbean islands	Tick	++
Maculatum disease	*Rickettsia parkeri*	Spotted fever	Americas	Tick	++
Tick-borne lymphadenopathy	*Rickettsia slovaca*	Spotted fever	Europe, Asia	Tick	+
Tick-borne lymphadenopathy	*Rickettsia raoultii*	Spotted fever	Europe, Asia	Tick	+
Unnamed	*Rickettsia massiliae*	Spotted fever	South America, Europe	Tick	+[a]
Pacific Coast tick fever	*Candidatus* R. philippii	Spotted fever	United States	Tick	+[a]
Unnamed	*Rickettsia aeschlimannii*	Spotted fever	Europe, Africa	Tick	+[a]
Unnamed	*Rickettsia monacensis*	Spotted fever	Europe	Tick	+[a]
Unnamed	*Rickettsia helvetica*	Spotted fever	Europe	Tick	+[a,b]
Asymptomatic or mild illness with seroconversion	*Rickettsia amblyommatis*	Spotted fever	Americas	Tick	±[b]
Typhus	*R prowazekii*	Typhus	South America, Africa, Eurasia	Body louse, ectoparasites of flying squirrels	++++
Murine typhus	*R typhi*	Typhus	Worldwide	Flea	+++
Rickettsialpox	*R akari*	Transitional	North America, Eurasia	Mouse mite	++
Queensland tick typhus	*R australis*	Transitional	Eastern Australia	Tick	++
Flea-borne spotted fever	*R felis*	Transitional	Worldwide	Flea	+

[a] Clinical data based on a limited number of patients reported in the literature.
[b] Implicated as a cause of subclinical infection with subsequent seroconversion.

1.5.1. Epidemiologia das rickettsioses do GFM

As rickettsias do GFM, transmitidas por várias espécies de carrapatos, ainda que associadas a quadros clínicos similares, possuem padrão epidemiológico distinto, relacionado à distribuição geográfica e ecologia de cada espécie vetora (CHAPMAN; BAKKEN; FOLK; PADDOCK *et al.*, 2006; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013).

1.5.1.1. Rickettsioses do GFM no continente americano

A denominação de cada rickettsiose em geral traduz o local de descobrimento, o que não necessariamente corresponde à sua área de distribuição. É o caso da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (FMMR), causada por *R. rickettsii*, descrita primeiramente no século XIX nos estados de Montana e Idaho. Todavia, sua

distribuição nos EUA vai além dos estados cortados pelas Montanhas Rochosas. Ainda, ela acomete toda a América, de forma endêmica no Canadá, México, América Central (Panamá e Costa Rica), Brasil, Colômbia e Argentina, com nomes locais como Febre de Tobia (Colômbia) e Febre Maculosa Brasileira (FMB), entre outros (ABARCA; OTEO, 2014; DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010; EREMEEVA, 2012; OTEO; NAVA; SOUSA; MATTAR *et al.*, 2014).

R. rickettsii foi descoberta no início do século 20, por Ricketts, como o agente da FMMR, nomeada em sua homenagem. Ricketts associou ainda carrapatos à sua transmissão. É a rickettsia de maior importância no continente, sendo considerada a de maior patogenicidade humana (ABARCA; OTEO, 2014; BLANTON, 2019; DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010). Transmitida por carrapatos duros, ela multiplica-se no citoplasma celular tanto do vertebrado quanto do vetor invertebrado que a transmite (DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010; KATO; CHUNG; ROBINSON; AUSTIN *et al.*, 2013).

Nos EUA, a FMMR ocorre nas regiões sudeste e centro-sul, transmitida por *Dermacentor variabilis*, e nos estados montanhosos do Oeste, por *D. andersoni*. Um recente surto de FMMR no Arizona e em Sonora (México) é atribuído à passagem de *R. rickettsii* para *Rhipicephalus sanguineus* (BLANTON, 2019; EREMEEVA, 2012).

A FMMR nos EUA predomina em homens, em indivíduos brancos, em crianças de cinco a nove e adultos entre 40 e 64 anos (DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010). No sudeste e centro-sul, estudos soro-epidemiológicos mostraram que até 22% das crianças tiveram exposição a rickettsias (CHAPMAN; BAKKEN; FOLK; PADDOCK *et al.*, 2006). Sua incidência tem aumentado nas últimas décadas, mas a letalidade se mantém inferior a 1,0%, exceto em áreas de alta endemicidade (KATO; CHUNG; ROBINSON; AUSTIN *et al.*, 2013).

Nas Américas do Sul e Central, os vetores associados à transmissão da Febre Maculosa (FM) são principalmente do gênero A*mblyomma* (*A. cajennense*, *A. sculptum*, *A. mixtum*, *A. patinoi*, *A. tonelliae*, *A. aureolatum*) (ABARCA; OTEO, 2014; BLANTON, 2019; OTEO; NAVA; SOUSA; MATTAR *et al.*, 2014). *R. rickettsii* também já foi encontrada em outras espécies de carrapatos no Brasil (ver abaixo), em *Haemaphysalis leporispalustris* na Costa Rica, *Dermacentor nitens* no Panamá e *A. imitatur* e *R. sanguineus* no México (ABARCA; OTEO, 2014).

A letalidade de FM causada por *R. rickettsii* varia entre 20 a 40% nos países latino-americanos. Também são relatados casos de adoecimento e óbito de animais

domésticos por *R. rickettsii*, como cães e ovelhas, associados ou não à ocorrência de infecção humana na mesma localidade, inclusive no Brasil (ABARCA; OTEO, 2014).

Até há pouco tempo, *R. rickettsii* era a única espécie do GFM implicada com doença humana. Todavia, nos últimos 20 anos, com a disponibilização de técnicas moleculares e de cultivo celular em tubo, outras espécies foram descritas, algumas associadas a quadros distintos da FM clássica (OTEO; NAVA; SOUSA; MATTAR *et al.*, 2014). Como exemplos, *R. parkeri* e *Candidatus R. philippii*, respectivamente, no continente e na costa do Pacífico dos EUA (BLANTON, 2019; EREMEEVA, 2012; SPOLIDORIO; LABRUNA; MANTOVANI; BRANDAO *et al.*, 2010).

Descrita pela primeira vez em *A. maculatum* em 1939 nos EUA, *R. parkeri* foi considerada não patogênica até 2004, quando os primeiros casos humanos foram reportados, inclusive casos anteriormente diagnosticados como FMMR. Na América do Sul, há confirmação no Uruguai, Argentina e Brasil. Por sua apresentação clínica mais similar à Febre Maculosa Mediterrânica, os primeiros casos no Uruguai foram inicialmente atribuídos a *R. conorii*. Somente *a posteriori*, *R. parkeri* foi confirmada. Seu principal vetor é *A. triste*. Infecção por *R. parkeri* é um risco para significativa população da região, pois *A. triste* é endêmico em ao menos 12 países. Ainda, a taxa de infecção por *R. parkeri* em várias espécies *Amblyomma* é maior que a de *R. rickettsii* em seus vetores (ABARCA; OTEO, 2014; EREMEEVA, 2012; SPOLIDORIO; LABRUNA; MANTOVANI; BRANDAO *et al.*, 2010).

Há no continente americano o registro de FM por *R. massiliae* confirmada por PCR na Argentina. Tal espécie já foi identificada em *R. sanguineus* nos EUA e na Argentina. Outras espécies têm sido descritas, mas sem confirmação de doença humana por ora: *R. bellii*, em espécies de *Amblyomma* no Brasil, Argentina e El Salvador; *Candidatus rickettsia andeanae*, do GFM, em *Amblyomma* no Peru, Argentina, Chile e EUA; *Rickettsia* sp. cepa *colombianensi*, em *Amblyomma* e em *Rhipicephalus microplus* na Colômbia, e *R. africae* em ilhas caribenhas (ABARCA; OTEO, 2014; EREMEEVA, 2012).

1.5.1.2. Rickettsioses do GFM na Europa, África e Ásia

No continente europeu, a rickettsiose de maior relevância, e a única do GFM até há pouco tempo, é a Febre Maculosa do Mediterrâneo (FMM), cujo agente é *R. conorii*, transmitida principalmente pelo carrapato canino *R. sanguineus*, descrita no

início do século 20. Essa síndrome, também relatada na África e Ásia, tem diversos nomes como Febre de Marselha, Febre Botonosa, FM de Astracã, Tifo do Carrapato Queniano, Tifo do Carrapato Israelense, Tifo do Carrapato Indiano, Febre Escaronodular de Ricardo Jorge (Portugal). Experimentalmente, mostrou-se que o cão pode ser um reservatório competente. A doença é mais frequente no verão, pois o carrapato é mais ativo. *R. sanguineus* pode ainda albergar *R. massiliae*, anteriormente considerada não patogênica, mas que vem sendo associada a quadro similar à FMM (BLANTON, 2019; GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005; OTEO; PORTILLO, 2012; PAROLA, 2004). Rickettsias menos frequentes, como *R. helvetica*, *R. aeschlimannii* e *R. monacensis*, são associadas a quadros similares à FMM. *R. helvética*, com casos na Suécia, Suíça, França e Itália, é suspeita de causar perimiocardite rickettsial, em casos fatais na Suécia (GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005; OTEO; PORTILLO, 2012; PAROLA, 2004).

A Rickettsiose Associada à Linfangite (*LAR*) é causada por *R. sibirica mongolitimonae*, com casos na França, Grécia, Portugal e Espanha, sem registro de óbito (OTEO; PORTILLO, 2012; PAROLA, 2004). Recentemente, outras rickettsias tais como *R. slovaca, R. raoultii* e *R. rioja* têm sido relacionadas a quadros clínicos similares denominados: Linfadenopatia Transmitida por Carrapato (*TIBOLA*), também descrita na Ásia e transmitida por *Dermacentor marginatus*, mais frequente nos meses mais frios, quando este carrapato apresenta maior atividade; Linfadenopatia, Eritema e Necrose transmitida por *Dermacentor* (*DEBONEL*) e a Linfadenopatia com Escara do Couro Cabeludo e do Pescoço (*SENLAT)*. Casos destas síndromes foram descritos na França, Espanha, Itália, Portugal, Bulgária e Hungria (BLANTON, 2019; GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005; OTEO; PORTILLO, 2012; PAROLA, 2004).

A FPCA é descrita na África subsaariana, causada por *R. africae* e transmitida por *Amblyomma hebraeum* e *A. variegatum*, carrapatos extremamente agressivos e espécie-inespecíficos. (BLANTON, 2019; PAROLA, 2004).

1.5.2. Epidemiologia das Rickettsioses do GT

O tifo epidêmico (exantemático), é causado por *R. prowazekii*, sendo uma das primeiras rickettsioses humanas descritas. Ele ocorre quando condições inadequadas de higiene permitem infestação por piolhos (*Pediculus humanus humanus*), como em guerras, desastres naturais e fome generalizada, em que há migrações em massa e

aglomerações. O piolho reside nas vestes e se infecta ao se alimentar em pessoa rickettsêmica. *R. prowazekii* infecta o epitélio de intestino médio do piolho e é eliminada nas fezes, sendo inoculada numa pessoa picada que esfregue a pele ou mucosas. O piolho não tolera temperaturas corporais altas e abandona indivíduos febris em busca de outros e, assim, dissemina a doença. O piolho não é reservatório da doença, pois sucumbe quando infectado. Já o paciente, após se recuperar, pode recrudescer se imunocomprometido (desnutrição, alcoolismo, idade avançada), condição chamada Doença de Brill-Zinsser (GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005). Um único caso recrudescente é capaz de iniciar uma epidemia. Os últimos surtos foram em Ruanda e Burundi. A doença é endêmica em áreas elevadas no Peru e foi descrita em outras regiões de alta altitude na América Latina. Ainda não foi descrita no Brasil (GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005). Um ciclo silvestre, descoberto na década de 1970, envolve esquilos voadores (*Glaucomys volans*), como reservatório extra-humano, no leste da América do Norte. Os esquilos podem ficar rickettsêmicos sem adoecer e transmitir a pessoas por contato próximo ou seus ectoparasitas. Focos de infecção foram relacionados à infestação de esquilos em paredes residenciais (BLANTON, 2019; EREMEEVA, 2012).

Ainda que esteja controlado, o tifo exantemático foi responsável por diversas epidemias na História e permanece como ameaça ante eventos socioambientais trágicos, com multidões e limitação de condições de higiene (ABARCA; OTEO, 2014).

O tifo murino, é conhecido como endêmico por sua endemicidade em boa parte do mundo, especialmente em áreas urbanas e portuárias com intenso tráfego naval no litoral de regiões tropicais e subtropicais. É causado por *R. typhi*, sendo *Rattus* sp. seu reservatório e transmitida pela pulga *Xenopsylla cheopsis*. A pulga elimina o patógeno nas fezes e a infecção humana é similar a do tifo epidêmico. A rickettsia não gera efeito deletério em ratos ou pulgas. Sua incidência é possivelmente subestimada, pois o quadro clínico é inespecífico. Tifo murino é a principal rickettsiose que acomete a Ásia e o Pacífico oriental. Nos EUA, seu pico foi em 1944, com mais de cinco mil casos notificados. O uso de diclorodifeniltricloretano (DDT) em meados da década de 40 reduziu drasticamente sua incidência para menos de 100 casos ao ano, na década de 50. DDT deve ter contribuído para a redução global de casos, que segue endêmico, atualmente, no sul da Califórnia e Texas, onde possivelmente sua transmissão esteja ligada à pulga felina (*Ctenocephalides felis*), sendo o gambá o hospedeiro amplificador (BLANTON, 2019).

Tifo murino é raramente diagnosticado no continente europeu, porém ocorre de forma endêmica nas ilhas Madeira e de Porto Santo, em Portugal. Casos esporádicos também já foram descritos na América do Sul, inclusive nos estados brasileiros de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e mais recentemente no Pará (GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005; MINERVINO; LABRUNA; DIAS; COSTA *et al.*, 2020; SILVA; PAPAIORDANOU, 2004; SPOLIDORIO; LABRUNA; MANTOVANI; BRANDAO *et al.*, 2010).

1.5.3. Epidemiologia das Rickettsioses do Grupo de Transição

As rickettsias patogênicas do GTr incluem *R. akari*, *R. australis* e *R. felis*. *R. akari* causa a rickettsiose vesicular (*rickettsialpox*) e infecta camundongos (*Mus musculus*) e seus ácaros (*Liponyssoides sanguineus*), que a transmitem por via transovariana à prole. A doença, reconhecida nas últimas décadas, já foi descrita em áreas urbanas dos EUA, além do México, Ucrânia, Croácia e Turquia. Não há registros no Brasil. *R. australis* é o causador do Tifo do Carrapato de Queensland, transmitida por *Ixodes holocyclus*, que acomete a costa leste australiana. A doença atribuída a *R. felis* é denominada FM transmitida por pulgas (*C. felis*), de distribuição universal. *R. felis* tem sido descrita em todo o globo, com emergência de doença humana em países europeus e africanos, além de Austrália e Nova Zelândia. Há registros de casos humanos no México e Brasil – neste confirmados por pesquisa de anticorpos e biologia molecular (mas sem isolamento), e também sua identificação no próprio vetor. *R. felis* tem sido descrita em artrópodos não hematófagos (psocópteros), como o piolho de livro e em mosquitos, além de carrapatos. Seu DNA foi identificado em pacientes febris mas também em indivíduos sadios, o que fez sua patogenicidade ser questionada (ABARCA; OTEO, 2014; BLANTON, 2019; GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005; SPOLIDORIO; LABRUNA; MANTOVANI; BRANDAO *et al.*, 2010).

1.6. Rickettsioses transmitidas por carrapato no Brasil

O primeiro reconhecimento de FMB no País deu-se no estado de SP, em 1929, sendo *R. rickettsii* considerada seu agente causal, o mesmo da FMMR, ainda que os vetores e, em consequência, a epidemiologia sejam distintos. É denominada Febre Maculosa Brasileira (FMB), tendo sido chamada de Tifo Transmitido por Carrapato e

Febre Petequial. É uma doença grave, com letalidade de 30 a 40% (GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013).

Até o ano 2000, apenas *R. rickettsii* era conhecida no Brasil. Todavia, nos últimos anos, foram identificadas outras espécies: *R. parkeri, R. rhipicephali, R. amblyommatis*, *R. bellii*, *R. typhi* e *R. felis* (SPOLIDORIO; LABRUNA; MANTOVANI; BRANDAO *et al.*, 2010; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013).

Em 2009, uma nova cepa de rickettsia filogeneticamente similar a *R. africae, R. parkeri* e *R. sibirica* foi isolada em lesões cutâneas de uma paciente em Peruíbe, litoral de SP. Em 2011, outro caso foi descrito na Bahia. Ela também foi achada em *A. ovale*, presente na Mata Atlântica, que na fase adulta pode picar tanto o cão como o ser humano, sendo nomeada cepa Mata Atlântica (SILVA; EREMEEVA; ROZENTAL; RIBEIRO *et al.*, 2011; SPOLIDORIO; LABRUNA; MANTOVANI; BRANDAO *et al.*, 2010; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013). Casos são descritos principalmente no Sul, Sudeste e Nordeste. Já a maioria de casos por *R. rickettsii* está no Sudeste. Até agora, essas são as duas principais espécies do GFM associadas à doença humana no País (FACCINI-MARTÍNEZ; MUÑOZ-LEAL; ACOSTA; DE OLIVEIRA *et al.*, 2018).

1.6.1. Distribuição dos casos de FMB no Brasil

A maioria de casos notificados de FMB é do Sudeste, seguido do Sul e casos esparsos em outras regiões a partir de 2005. De 2000 a 2019, há aumento gradual de casos, conforme dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (anexo I) (SINAN, 2020). A maioria ocorre em SP, com casos em Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo, além de Santa Catarina, Paraná e Bahia (DE LEMOS; ALVARENGA; CINTRA; RAMOS *et al.*, 2001; DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010; GALVÃO; LAMOUNIER; BONOMO; TROPIA *et al.*, 2002). A notificação de FM no Brasil, todavia, não considera seus diferentes agentes causais descritos até o momento, os quais têm distintos padrões de distribuição.

Entre 1989 e 2008, foram registrados 737 casos no País, com letalidade de 25,2%, sendo 591 casos no Sudeste, com letalidade de 31,4% (DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010). A distribuição de óbitos por UF entre 2000 e 2019 é mostrada no anexo II (SINAN, 2020). Em nível nacional, só em 2018, foram 237 casos com 88 óbitos (letalidade de 37%), quase todos no Sudeste.

A FMB possui padrão sazonal, com maior incidência entre junho e outubro, período de maior atividade do carrapato e, portanto, o mais provável de interação com pessoas (DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010).

1.6.1.1. FMB no Estado de São Paulo

O primeiro foco de FMB no Brasil ocorreu na cidade de SP, na década de 1920. Posteriormente, casos foram diagnosticados na Grande SP, abrangendo a cidade de Mogi das Cruzes e Santo Amaro, atual distrito da Capital. Recentemente, a região de Campinas, nas bacias hidrográficas dos rios Atibaia e Jaguari, passou a ser o principal foco endêmico (DE LIMA; DE SOUZA; DE SOUZA; VILELA *et al.*, 2003; GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005).

Nas últimas décadas, novos casos de FMB foram registrados na Grande SP, especialmente na região sul. Outras regiões do Estado também têm tido casos, como na bacia do rio Piracicaba (GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005).

Entre 2007 e 2019, foram confirmados 870 casos autóctones de FMB no estado de SP, com 464 óbitos (letalidade de 54,6%). A **tabela 2** mostra a distribuição de casos e óbitos, por ano, no Estado (SINAN, 2020). Houve um aumento progressivo na letalidade, com sua estabilização a partir de 2016. A FMB é a doença mais letal dentre as transmitidas por vetor no Sudeste (SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013).

Tabela 2: Casos confirmados autóctones e letalidade da FMB em SP, segundo o ano de início de sintomas (IS), de 2007 a 2019 (FONTE: SINAN).

Ano IS	Ign/Branco	Cura	Óbito por FMB	Óbito por outra causa	Total	Letalidade
2007	0	21	12	0	33	36,4
2008	1	27	16	0	44	37,2
2009	1	36	26	0	63	41,9
2010	0	35	25	0	60	41,7
2011	2	34	35	0	71	50,7
2012	0	30	43	0	73	58,9
2013	2	24	30	0	56	55,6
2014	0	16	56	1	73	77,8
2015	2	32	56	1	91	63,6
2016	0	27	38	0	65	58,5
2017	2	26	31	2	61	54,4
2018	0	46	59	1	106	56,2
2019	3	32	37	2	74	53,6
Total	**13**	**386**	**464**	**7**	**870**	**54,6**

Dentre esses 870 casos, 668 eram do sexo masculino (76,8%) e 270 (31,0%) tinham idade entre 20 e 29 anos. Tais informações estão explicitadas na **figura 2**.

Entre 2007 e 2020, foram notificados mais de 20 mil casos suspeitos de FMB no estado de SP. Destes, 969 foram confirmados laboratorialmente (4,4%), outros 19.026 descartados e os resultados dos demais 2073 casos foram inconclusivos ou desconhecidos (SINAN, 2020). Observa-se anualmente um incremento no número de confirmações de FMB no Estado. A maioria dos casos está concentrada na região de Campinas, seguida pela região de Piracicaba e área metropolitana de SP, conforme dados parciais até fevereiro de 2020 mostrados no anexo III (fonte: SINAN).

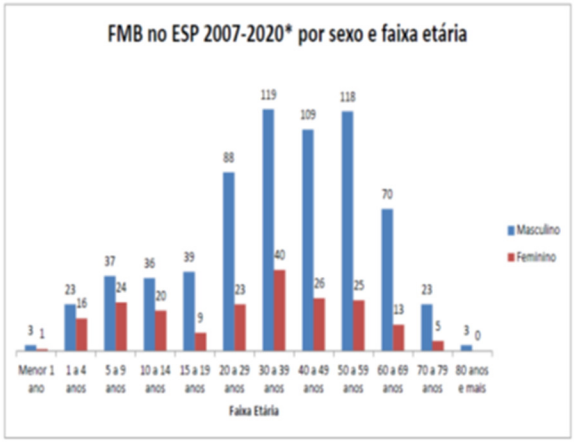

Figura 2*:* Distribuição de casos de FMB por sexo e faixa etária no estado de São Paulo (FONTE: SINAN).

Na região de Ribeirão Preto, foram confirmados sete casos de FMB entre 2007 e 2019. No munícipio, houve um caso em 2004, dois em 2011 e um caso em 2015, totalizando quatro casos no período (SINAN, 2020).

1.6.2 Vetores e Reservatórios da FMB

Os seres humanos são acidentalmente acometidos por FMB em contato com o meio rural e em atividades recreativas, onde o encontro com carrapatos infectados em vida livre ou em animais domésticos (cães, cavalos) ou silvestres (capivara) é mais provável. Estes últimos contribuindo por manter *R. rickettsii* em carrapatos vetores na natureza (FACCINI-MARTÍNEZ; MUÑOZ-LEAL; ACOSTA; DE OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Em vida livre, os carrapatos permanecem em pastos e gramados, geralmente protegidos da exposição solar e em locais próximos a fontes de água (De SáDEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010).

O ciclo vital de carrapatos duros tem quatro estágios e dura em torno de um ano: a partir da eclosão dos ovos em março, as larvas (hexápodes), que podem ficar

sem alimentação por até seis meses, se tornam ninfas (octópodes), geralmente em julho. Estas podem ficar sem alimento por até um ano. Entre novembro e março, as ninfas se tornam adultos (octópodes), os quais sobrevivem por até dois anos sem alimentação (DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010).

A transmissão da FMB ocorre a partir da picada de carrapatos infectados por *R. rickettsii*, nas fases larval, de ninfas ou adulta. O carrapato deve permanecer se alimentando por um período de seis a 10 horas. Picadas de larvas e ninfas, menos dolorosas, devem ser mais efetivas na transmissão rickettsial do que as dos adultos, que são mais facilmente percebidos e retirados. Todavia, ao se tentar retirar um espécime aderido à pele, há ainda a possibilidade da transmissão por esmagamento do mesmo (DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010).

São descritas 64 espécies de carrapatos no País. Duas, *Amblyomma sculptum* e *A. aureolatum*, são consideradas as principais transmissoras da FMB, sendo *R. sanguineus* suspeito de transmitir em situações específicas (SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013). Até há pouco tempo, *A. sculptum* era denominado *A. cajennense*. Estudos moleculares, entretanto, evidenciaram que *A. cajennense* é um complexo de seis espécies, do qual *A. sculptum* é um dos componentes (LABRUNA; KRAWCZAK; GERARDI; BINDER *et al.*, 2017) *A. sculptum* é muito comum em regiões neotropicais. No Sudeste, o cenário mais associado à transmissão de FMB é a infestação massiva de *A. sculptum* num de seus principais hospedeiros: a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *A. sculptum* também é encontrado infestando cavalos, especialmente quando se alimentam em pastagens com vegetação alta e próximas a matas ciliares (DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013). Além de reservatório, a capivara atua como amplificadora e disseminadora de rickettsia entre carrapatos (SOUZA; MORAES-FILHO; OGRZEWALSKA; UCHOA *et al.*, 2009). *A. sculptum* possui ainda comportamento antropofílico (GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005).

Capivaras são o principal hospedeiro de *A. dubitatum*, cuja distribuição inclui áreas de Cerrado, Mata Atlântica e floresta de araucárias. Mas seu papel como vetor rickettsial é desconhecido. Experimentos mostraram que gambás (*Didelphis aurita)* e cães domésticos podem ser hospedeiros amplificadores competentes de carrapatos com *R. rickettsii*. Porém, são necessários mais estudos para avaliar seu papel na transmissão de FMB em áreas endêmicas (SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013).

Amblyomma Aureolatum é um carrapato neotropical encontrado no leste da América do Sul, notadamente na Mata Atlântica. Comparado a *A. sculptum*, é muito mais suscetível a *R. rickettsii* e mais competente em manter a infecção, com 100% de transmissões transestadial e transovariana e altas taxas de infecção filial. Todavia, FMB relacionada a *A. aureolatum* parece ser restrita a situações em que cães fazem incursões em matas tropicais e carreiam carrapatos infectados para domicílios e ali, estes, acidentalmente, picam pessoas (SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013).

A ocorrência de FMB associada a *R. sanguineus* é especulativa. Principal vetor da FMM na bacia mediterrânica e implicado em doença humana por *R. rickettsii* (EUA e México), ele foi introduzido no Brasil na colonização. É o carrapato comum do cão, hospedeiro-específico, de distribuição universal, restrito a áreas urbanas e capaz de causar infestações peridomiciliares. Picadas em outros animais, incluso o ser humano, são acidentais, quando cães não estão mais acessíveis ou estão protegidos por repelentes. O achado de escara única na FMM reforça que sua picada é rara (EREMEEVA, 2012; PAROLA, 2004; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013). Há alguns anos, descobriu-se que *R. sanguineus* do País são duas espécies distintas genética, morfológica e geograficamente. Em laboratório, mostrou-se que a espécie presente em áreas tropicais é um vetor competente de *R. rickettsii* e esta não lhe causa efeito deletério, ao contrário do que ocorre com *A. sculptum* e *A. aureolatum*. Já foi detectada a infecção natural de *R. sanguineus* por *R. rickettsii* em áreas endêmicas de FMB, mas nenhum caso humano descrito envolvendo esse vetor. É hipotetizado que cães com *R. sanguineus* transitem tanto por zonas urbanas como florestais próximas, sendo, nestas, parasitados por *A. sculptum* ou *A. aureolatum* infectados com *R. rickettsii*. Cães rickettsêmicos infectariam então *R. sanguineus*, em áreas endêmicas de FMB. De fato, foi demonstrado nestas áreas maior taxa de infecção por *R. rickettsii* em *R. sanguineus* do que em *A. aureolatum* (SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013).

Por sua vez, a síndrome febril associada à *R. parkeri* cepa da Mata Atlântica está associada à exposição acidental a *A. ovale*, presente em áreas conservadas de Mata Atlântica, especialmente no Sul e Sudeste (FACCINI-MARTÍNEZ; MUÑOZ-LEAL; ACOSTA; DE OLIVEIRA *et al.*, 2018; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013).

1.7. Patogenia

Após a inoculação através da pele, rickettsias são fagocitadas por células dendríticas e carreadas por vasos linfáticos a linfonodos locais, onde replicam e então podem disseminar pela corrente sanguínea, atingindo cérebro, pulmões, tegumento, fígado, coração, baço, pâncreas, trato gastrintestinal, entre outros órgãos (BLANTON, 2019; DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010).

As rickettsias de importância médica têm tropismo por células endoteliais, em especial de pequenos e médios vasos. Podem infectar células perivasculares como monócitos, macrófagos, hepatócitos e células da musculatura lisa, disseminando-se por todo o sistema vascular (DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010; MANSUETO; VITALE; CASCIO; SEIDITA *et al.*, 2012).

Rickettsias, especialmente do GFM, invadem os endoteliócitos após ligarem-se a receptores que contenham colesterol. Tal ligação ocorre entre suas proteínas de superfície (OmpA e OmpB) e o receptor celular Ku70. Sua penetração se processa por fagocitose induzida. O rompimento do fagossoma resultante libera bactérias no citoplasma, onde estas se multiplicam por divisão binária, com taxa de replicação calculada em cerca de 10 minutos (DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010; MANSUETO; VITALE; CASCIO; SEIDITA *et al.*, 2012).

A proliferação rickettsial no endotélio vascular produz lesões, o que gera um processo inflamatório agudo, com produção e liberação de citocinas e moléculas de adesão celular, desregulação imunitária transiente com diminuição na circulação de linfócitos T CD4 periféricos e infiltração perivascular por linfócitos T CD4 e CD8, B e macrófagos. O aumento da permeabilidade capilar está associado à carga bacteriana e à quantidade de liberação de Fator de Necrose Tumoral (TNF) α e Interferon (IFN) γ, podendo desencadear vasculite sistêmica. Hipoalbuminemia e hipovolemia podem decorrer da permeabilidade vascular aumentada. Hormônio antidiurético pode ser secretado em resposta à hipovolemia, provocando hiponatremia. A lesão endotelial pode causar um estado procoagulante, com ativação da cascata da coagulação, liberação de trombina e fatores antifibrinolíticos e aumento da agregação plaquetária. O alto consumo de plaquetas gera trombocitopenia, vista em cerca de 40% dos casos. Trombose na microcirculação pode ser observada nos pulmões, rins, coração e no cérebro. Daí, pode haver necrose tissular e isquemia cerebral (mesencéfalo e núcleos da base). A vasculite rickettsial é caracterizada por estes mecanismos, em diferentes

graus de intensidade (ABDAD; ABOU ABDALLAH; FOURNIER; STENOS *et al.*, 2018; DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010; MANSUETO; VITALE; CASCIO; SEIDITA *et al.*, 2012).

A depleção de ATP, com o subsequente comprometimento da função da bomba de sódio na membrana celular, parece ser o mecanismo do dano endotelial resultante da infecção rickettsial. Os endoteliócitos são ativados pós-infecção, com liberação de citocinas que promovem reação de fase aguda e ativação de fagócitos e células NK. Estas últimas, e linfócitos CD8, são vistos no infiltrado perivascular, o que pode representar o esforço do organismo em controlar a infecção. O padrão da resposta imunitária mediada por citocinas TH1 ou TH2 parece ser relevante na contenção do processo infeccioso (DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010; MANSUETO; VITALE; CASCIO; SEIDITA *et al.*, 2012).

1.8. Quadro Clínico das Rickettsioses

Os sintomas mais comuns para a maioria das rickettsioses são febre, *rash* e escaras tegumentares, em diferentes combinações, os quais todavia não são patognomônicos (PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017).

No local da picada do carrapato pode ser vista escara negra (*tache noir*) poucos dias após, resultado da multiplicação rickettsial, e sua intensidade associada a melhor controle da infecção. (ABDAD; ABOU ABDALLAH; FOURNIER; STENOS *et al.*, 2018). Ela é comum na FMM e FPCA (72 e 95%, respectivamente), única na primeira e múltipla na última; e infrequente na FMMR e FMB (BLANTON, 2019; PAROLA, 2004).

1.8.1. Manifestações Clínicas do GFM:

O período de incubação (PI) para o GFM varia entre seis e 14 dias, após a picada do carrapato. O espectro clínico vai de quadros brandos, em rickettsioses por *R. slovaca* e *R. parkeri*, a formas graves por *R. rickettsii*. Tais quadros, além de variarem em função da espécie, são a expressão da magnitude da vasculite causada pela multiplicação rickettsial endotelial. Por sua vez, a vasculite é influenciada pelo *status* imunitário, que determina o padrão de resposta inflamatória (ABARCA; OTEO, 2014; BLANTON, 2019; MANSUETO; VITALE; CASCIO; SEIDITA *et al.*, 2012).

Alguns patógenos levam à soroconversão sem ou com poucos sintomas. A grande maioria produz uma síndrome febril aguda indiferenciada, confundível facilmente com outros quadros, em especial nos trópicos, onde doenças transmitidas por mosquitos e outras doenças tropicais são prevalentes (BLANTON, 2019).

Os sintomas mais comuns são febre, cefaleia, mialgia e mal-estar, com vários padrões de lesões cutâneas. O *rash* varia de macular, maculopapular, papulovesicular ou petequial, leve à intenso, restrito às palmas e plantas ou disseminados, com ou sem escara de inoculação. Este *rash* pode estar presente em 97% dos casos de FMM, em 90% na FMMR, 46% na FPCA e 2% em TIBOLA. Apresentações maculovesicular ou maculopustular já foram descritas na FPCA e em infecções por *R. parkeri* (ABARCA; OTEO, 2014; BLANTON, 2019). TIBOLA, com PI de cinco dias (entre um e 15 dias), é talvez a FM mais leve: além de soroconversão assintomática, os sintomas costumam ser locais. No local da picada (couro cabeludo, pescoço ou outras áreas da cabeça), surge *rash* com linfadenomegalia regional em todos os casos. O *rash* se inicia como pápula ou vesícula e evolui com necrose exsudativa, que progride para crosta com alopecia adjacente. Febre baixa, astenia, cefaleia e *rash* ocorrem, respetivamente, em 26, 16 e 2% dos casos. A febre pode persistir por meses e a alopecia por anos (GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005; OTEO; PORTILLO, 2012; PAROLA, 2004).

A FMM apresenta-se como quadro febril agudo após PI médio de sete dias (entre quatro e 21 dias). Em mais de 72% dos casos, há a *tache noir* no local da picada. A doença cursa com calafrios, cefaleia, fotofobia, artralgia e mialgia. Após três a cinco dias do início da febre, surge *rash* maculopapular, em geral nas extremidades palmar e plantar. A evolução da maioria dos casos é benigna. Raros casos graves são mais arrastados, sem escara de inoculação e com exantema atípico, evoluindo com quadro neurológico e falência de múltiplos órgãos e óbito. Estudos têm demonstrado que os quadros graves estão associados a cepas do complexo *R. conorii*. A letalidade da FMM é de 2,5%. Já os pacientes com LAR apresentam febre, exantema maculopapular, linfadenomegalias e múltiplas escaras (GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005; OTEO; PORTILLO, 2012; PAROLA, 2004).

Na FMMR, as manifestações mais comuns são febre elevada (> 39 ºC), cefaleia e *rash* (KATO; CHUNG; ROBINSON; AUSTIN *et al.*, 2013). A febre pode ser acompanhada de bradicardia relativa (sinal de Faget), especialmente após a primeira semana. A cefaleia comumente frontal pode ser intensa e mimetizar meningite, mas

sem rigidez nucal. O *rash* inicialmente maculopapular pode surgir primeiro em pulsos e tornozelos e só depois no tronco. Após três a cinco dias, este se torna gradualmente petequial. Esse padrão é útil no diagnóstico diferencial com erliquiose, anaplasmose e enteroviroses. Mialgia pode ser intensa, em especial na musculatura abdominal, dorsal e nas panturrilhas. Linfadenomegalia está presente em 27% dos casos. Manifestações menos comuns são tosse, náuseas, vômitos, dor e distensão abdominais, insônia, agitação, surdez aguda, edema periorbitário, sufusão conjuntival, edema em mãos e pés, miocardite, hepato e esplenomegalia e hipotensão arterial. Sintomas gastrintestinais, como dor abdominal, náuseas e vômitos, pode se associar a severidade (BLANTON, 2019; CUNHA, 2008).

O PI da FMB é em média sete dias (de dois e 14 dias), estando relacionado ao volume do inóculo inicial (DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010). Sua apresentação inclui formas leves a graves (SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013), em proporção à intensidade e extensão do dano endotelial pela multiplicação rickettsial e à consequente reação inflamatória, o que pode progredir para vasculite disseminada, com quadros graves e morte. Pode haver acometimento cutâneo (de *rash* à necrose), musculoesquelético, pulmonar, cardíaco, renal, gastrintestinal, cerebral e distúrbios da coagulação (ABARCA; OTEO, 2014).

Como na FMMR, na fase inicial da FMB, a febre é comum e pode ser elevada (> 39º C), súbita e acompanhada de calafrios. Podem ocorrer cefaleia, em geral intensa, náuseas, vômitos, mialgia, artralgia, hiporexia, astenia, mal-estar, *rash*, hiperemia conjuntival, fotofobia, dor abdominal e diarreia. Hepatoesplenomegalia pode ser vista em um terço dos casos. O *rash*, usualmente maculopapular mas que pode ser petequial, costuma ter distribuição centrípeta: começa nas extremidades, palmas das mãos e plantas dos pés, ou punhos e tornozelos, disseminando após para o tronco; porém, pode iniciar no tórax. Ainda que característico, o padrão palmar e plantar é variável, em 40 a 80% dos casos. As máculas no início são róseas e somem se comprimidas, de bordos mal definidos, com 2 a 6 mm de diâmetro. Posteriormente, tornam-se escuras e fixas. *Rash*, que pode ser a principal manifestação a levantar hipótese de FMB, é visto em poucos casos no primeiro dia de doença, mas presente em cerca de 50% e 90%, respectivamente, nos terceiro e quinto dias. A demora no surgimento do *rash* leva a atraso diagnóstico e pior prognóstico, ao retardar início de terapia. Ausência de exantema é mais comum em idosos e negros (ABARCA; OTEO, 2014; DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010).

Formas graves de FMB podem cursar com insuficiência renal pré-renal, por desidratação e hipovolemia devido ao aumento da permeabilidade vascular e requerer diálise. Edema generalizado pode resultar da hipoproteinemia. Edema pulmonar pode causar dispneia, tosse e derrame pleural e levar à insuficiência respiratória, necessitando de oxigênio ou assistência ventilatória. Podem ocorrer icterícia, sinais neurológicos (parestesias, fraqueza muscular, confusão mental, em 28% dos pacientes), delírio (20 a 26%), estupor, coma (10%), ataxia (5 a 18%), convulsões (8%), meningencefalite, múltiplas equimoses, sufusões hemorrágicas, miocardite, derrame pericárdico, choque circulatório e falência múltipla de órgãos, o que pode levar a óbito. Necrose tecidual e gangrena, em especial de dedos e orelhas, ocorrem em até 4% dos casos (ABARCA; OTEO, 2014; BLANTON, 2019; DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010).

Já a FM por *R. parkeri* cepa da Mata Atlântica cursa com quadro mais brando (FACCINI-MARTÍNEZ; MUÑOZ-LEAL; ACOSTA; DE OLIVEIRA *et al.*, 2018). A **tabela 3** compara manifestações da FM por *R. parkeri* e *R. rickettsii* na América Latina.

Tabela 3: Quadro clínico das principais FM da América Latina (FONTE: ABARCA; OTEO, 2014)

Manifestações	***Rickettsia rickettsii***	***Rickettsia parkeri***
Febre	Sim	Sim
Mialgia e artralgia	Sim	Sim
Exantema	Sim (20-100%)	Ocasional
Características do exantema	Máculo-papular ou petequial	Macular ou máculo-papular. Foram descritas vesículas, pústulas e petéquias
Evolução do exantema	Início nas extremidades, progressão para o tronco. Padrão palmo-plantar	Tronco e extremidades
Lesões hemorrágicas (equimoses, bolhas hemorrágicas, necrose distal)	Sim	Não
Comprometimento neurológico	Sim (em crianças)	Não
Escara no local de inoculação	Não	Sim
Linfadenopatia regional dolorosa	Não	Sim
Outras manifestações descritas	Náuseas, vômitos, dor abdominal e fotofobia	Fotofobia, hiperemia conjutival, dor de garganta, diarreia, lesões ulceradas orais dolorosas
Surtos descritos	Sim	Não
Gravidade da infecção	25% dos casos	Curso benigno
Letalidade	Sim (20-95%)	Sem casos letais relatados
Sequelas	Sim	Não

Na América Latina, a principal distinção da FM por *R. parkeri* e por *R. rickettsii* é que a primeira tem, além do curso benigno, usualmente escara de inoculação similar a *tache noir*. Ocorrem febre, *rash* maculopapular não pruriginoso, linfadenomegalia

regional, cefaleia, artralgia e mialgia. O *rash* ocorre em extremidades e tronco, podendo ter lesões vesiculares, pustulosas e raramente petequiais. Podem ser vistos fotofobia, odinofagia, úlceras orais, diarreia e hiperemia conjuntival (ABARCA; OTEO, 2014; SPOLIDORIO; LABRUNA; MANTOVANI; BRANDAO *et al.*, 2010).

Sequelas são descritas nos sobreviventes de infecção por *R. rickettsii*, em especial neurológicas: *deficit* motor, alterações da fala, deglutição e de sensibilidade. Necropsias de casos de FM por *R. rickettsii* na América Latina revelam vasculite difusa em múltiplos órgãos, de padrão linfohistiocitário ou necrosante, com miocardite, encefalite, nefrite, pneumonia intersticial e linfadenite (ABARCA; OTEO, 2014).

1.8.3. Manifestações Clínicas do GT

Os tifos endêmico e epidêmico apresentam febre súbita, cefaleia e mialgia. *Rash* é variável e escara local rara. Sintomas grastrointestinais estão presentes em metade dos casos. O tifo epidêmico é mais grave que o endêmico e pode ter quadro neurológico. A letalidade do tifo epidêmico é de 13% (chegando a 50% nos casos graves) e a do murino é 0,4% (até 4% nos graves) (BLANTON, 2019).

1.8.3. Manifestações Clínicas das Rickettsioses do Grupo de Transição

A rickettsiose vesicular é uma doença benigna que inicia com lesão eritêmato-papular no local da picada do ácaro, nos dois primeiros dias após. Posteriormente, a lesão se torna vesicular e, a seguir, uma escara com indução e edema adjacentes. Febre súbita, calafrios, linfadenopatia local, cefaleia e mialgia aparecem uma a duas semanas após e, por fim, surge uma erupção cutânea difusa, de início macular e que evolui para pápulas, vesículas e crostas, similarmente à varicela (BLANTON, 2019).

O tifo do carrapato de Queensland é semelhante às rickettsioses do GFM, mas brando. Eritema maculopapular ocorre em até 90% dos casos e a escara local em 65%, associada à linfadenopatia local. FM transmitida por pulga também está no polo benigno das rickettsioses, com *rash* em até 75% dos casos e escara em 13%. O exantema é macular ou maculopapular e não petequial. São comuns febre, cefaleia, artralgia, mialgia e sintomas respiratórios e abdominais. O quadro tem rápida recuperação, mesmo sem terapia (ABARCA; OTEO, 2014; BLANTON, 2019).

1.9. Diagnóstico das Rickettsioses

O diagnóstico das rickettsioses é geralmente clínico e baseado em dados epidemiológicos, como picadas de artrópodos, residência ou visita a áreas endêmicas ou rurais. Picadas podem passar desapercebidas, o que exige profunda investigação e conhecimento. Quando há suspeita, tratamento empírico deve ser prontamente iniciado, pois exames laboratoriais de rotina são inespecíficos e testes confirmatórios demorados e limitados. Estes comumente confirmam ou descartam o diagnóstico clínico retrospectivamente (ABARCA; OTEO, 2014; KATO; CHUNG; ROBINSON; AUSTIN *et al.*, 2013; PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017).

Exames de rotina podem auxiliar na diferenciação entre FM e febre tifoide ou exantemas virais. O hemograma comumente apresenta trombocitopenia e contagens normais de leucócitos e hemácias; porém anemia, leucopenia ou leucocitose com desvio à esquerda também são notados. Elevação leve a moderada de transaminases e bilirrubinas, creatinina, desidrogenase lática, creatinafosfoquinase e de marcadores de fase aguda como a Proteína C Reativa, pode ser vista. Hipoalbuminemia decorre da vasculite e causa edema (periorbitário, pulmonar e em extremidades). São também descritos hiponatremia e albuminúria. Pela multiplicação rickettsial em vasos meníngeos, o liquor pode revelar pleocitose em geral leve (de 10 a 100 células/ml, de predomínio mono e menos comumente polimorfonuclear), hiperproteinorraquia e glicorraquia e lactato normais. Tais alterações liquóricas são vistas em cerca de 35% dos casos. Radiografias de tórax inicialmente não revelam infiltrados pulmonares, que podem surgir tardiamente, de padrão intersticial ou alveolar, como resultado de miocardite, hiperidratação ou SARA. Íleo paralítico pode ser visto em grafias de abdome. Em casos de miocardite, alterações de baixa voltagem no segmento ST-T e vários graus de bloqueio atrioventricular podem estar presentes (ABARCA; OTEO, 2014; ABDAD; ABOU ABDALLAH; FOURNIER; STENOS *et al.*, 2018; CUNHA, 2008; DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010).

A análise de artrópodos capturados no sítio presumido de transmissão ou a parasitar o paciente, se possível, pode auxiliar no diagnóstico, e sua eventual infecção por rickettsias é ainda útil em regiões onde sua circulação seja desconhecida. Detecção rickettsial em artrópodos de vida livre ou a parasitar outros animais pode ser feita usando as colorações de Gimenez e Giemsa, nas quais rickettsias se coram em vermelho no citoplasma de células infectadas. Contudo, esse método não permite a

diferenciação de espécies. Ainda, hemolinfa de carrapatos viáveis ou do extrato de glândulas salivares de espécimes congelados pode ser examinada em lâminas coradas em microscopia óptica (GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005; PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017; RICHARDS, 2012).

Hospedeiros vertebrados (mamíferos selvagens e domésticos de pequeno a grande porte, aves, etc) podem ter amostras de sangue e tecido testadas por métodos diretos e indiretos quanto à presença de rickettsias (RICHARDS, 2012).

A confirmação laboratorial de rickettsiose humana é feita principalmente por métodos indiretos, através da pesquisa de anticorpos. O teste de Weil-Felix é uma reação de aglutinação, estabelecida em 1921, de fácil execução e baixo custo, de uso anteriormente amplo. Ela pesquisa anticorpos séricos aglutinantes que reajam a diferentes cepas de *Proteus* sp. Essas aglutininas são IgM, detectáveis a partir do quinto ao décimo dia do início dos sintomas. Cada cepa de *Proteus* tem epítopos antigênicos similares a lipopolissacarídeos da membrana de cada grupo rickettsial. Soro do tifo epidêmico reage com *Proteus vulgaris* OX19 e a maioria do GFM interage com *Proteus* OX2. O teste não é usado em suspeita de doença de Brill-Zinsser, pois não há produção de IgM. É um método limitado e de baixa acurácia por usar antígenos inespecíficos com reação cruzada com soro de pacientes infectados previamente com *Proteus* e outras α-proteobactérias de epítopos similares como *Legionella sp* e *Brucella sp* (GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005; RICHARDS, 2012).

Imunofluorescência indireta (IFI) é atualmente o exame mais usado sendo referência, seguindo recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 1987, com sensibilidade e especificidade maiores. IFI utiliza rickettsias ou antígenos espécie-específicos fixados em lâmina. Após a adição de amostras clínicas, eventuais anticorpos anti-rickettsia se ligam a antígenos de superfície na lâmina. Essa ligação é revelada por Ig (anti-humana ou canina) marcada com fluoresceína (conjugado), que se liga aos anticorpos na lâmina. Há conjugados comerciais anti-Ig total, anti-IgG e anti-IgM. A detecção dos anticorpos depende do período de coleta da amostra: na maioria das rickettsioses, estes só são detectáveis sete a 10 dias após o início da doença. Na FPCA podem ser necessários 25 dias (ABDAD; ABOU ABDALLAH; FOURNIER; STENOS *et al.*, 2018; DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010; PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017).

Detecção de IgM está fortemente relacionada à doença em atividade, porém é mascarada por fenômeno prozona e influenciada por auto-anticorpos e Fator

Reumatóide, além da possibilidade de reação cruzada entre GFM e GT e com outros patógenos. Logo, anticorpos M, ainda que mais precoces que IgG e podendo perdurar por meses, não são comumente usados no diagnóstico de rickettsioses, pois são menos específicos. Anticorpos G começam a ser detectáveis uma semana após o início da doença, são específicos em seu biogrupo e podem persistir por até quatro anos. Entretanto, reação cruzada pode ocorrer entre espécies do mesmo grupo, limitando o diagnóstico específico, o que pode requerer dados epidemiológicos e clínicos para definição etiológica. Ainda, baixos títulos de anticorpos M e G podem representar reação inespecífica ou resultar em falso-negativos, em particular se pesquisados em amostra única (GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005; PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017; RICHARDS, 2012).

Por isso, IFI requer amostras pareadas: a primeira por ocasião dos sintomas iniciais e a segunda, duas a seis semanas após, na fase de convalescência, para avaliar eventual soroconversão ou soro-reforço (aumento de ao menos quatro vezes no título de anticorpos), pela ausência de teores altos de anticorpos na primeira semana. Títulos de anticorpos em amostras isoladas podem apenas confirmar exposição, mesmo prévia, a alguma espécie rickettsial, não sendo possível atribui-los à doença ativa (DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010; GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005; OTEO; NAVA; SOUSA; MATTAR *et al.*, 2014; PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017).

Na tentativa de minimizar reações cruzadas de IFI entre diferentes espécies, alguns laboratórios utilizam a microimunofluorescência, a qual permite testagem simultânea de antígenos de diferentes espécies na mesma placa. Resultado positivo para antígeno de determinada espécie é considerado se títulos de IgG ou IgM são ao menos duas diluições sequenciais superiores aos observados com antígeno de outra espécie (PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017).

Antibióticos, específicos ou não para o tratamento de rickettsioses, podem interferir nos resultados tanto da reação de Weil-Felix como na IFI, ainda que de maneira menor nesta última (GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005).

Reação de adsorção cruzada pode ser usada para a identificação da espécie, quando há reação de anticorpos a mais de um antígeno rickettsial. Ainda que sensível, essa técnica é cara e laboriosa, pois requer testar grande número de espécies (PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017; RICHARDS, 2012).

Outros métodos sorológicos como Western Blot, teste de imunoperoxidase e ELISA têm baixa reprodutibilidade no diagnóstico de rickettsioses e exigem antígenos purificados. Western blot pode ser considerado mais sensível que IFI, com detecção mais precoce de IgM (contra lipopolissacarídeos), e presumidamente mais específico, por detectar anticorpos mais tardios contra antígenos específicos de proteínas da membrana externa rickettsial, mas requer ampla coleção de antígenos. É recomendado para estudos de soroprevalência. Testes imunoenzimáticos também podem ser usados no diagnóstico, mas possuem baixas especificidade e sensibilidade (GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005; PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017; RICHARDS, 2012).

Técnicas de imuno-histoquímica e histopatológicas em amostras tissulares obtidas por biópsia ou necropsia estão entre os métodos diretos. De rápida execução, são relativamente sensíveis (70%) e altamente específicas (100%), pois demonstram antígenos rickettsiais no endotélio. Por outro lado, tais técnicas são limitadas na prática pela pouca disponibilidade de anticorpos monoclonais e pela dificuldade em obtenção de amostras de biópsias, ante a facilidade de amostras de sangue, o que torna os métodos sorológicos preferenciais. Ainda, anticorpos são comumente grupo-específicos ao invés de espécie-específicos (GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005; PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017).

O isolamento de rickettsia em cultura celular é o método mais específico e, portanto, o padrão-ouro no diagnóstico (OTEO; NAVA; SOUSA; MATTAR *et al.*, 2014). Entretanto, possui baixa sensibilidade (PARIS; BLACKSELL; STENOS; GRAVES *et al.*, 2008; RICHARDS, 2012), sendo influenciado por antibióticos. É laborioso, requer laboratórios de biossegurança nível três[2] e equipe qualificada (PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017; RICHARDS, 2012). O cultivo não permite habitualmente a diferenciação de espécies e é lento. O isolamento é relevante em casos graves e no início da sintomatologia, quando há rickettsemia mas sem anticorpos detectáveis. Permite a produção antigênica para IFI, a caracterização molecular da espécie e contribui para o conhecimento genético, fisiopatogênico, estudos de suscetibilidade antimicrobiana e de aprimoramento de testes diagnósticos. Podem ser cultivados artrópodos e amostras humanas, tais como de sangue (total, plasma, soro, creme leucocitário, coágulo, monócitos periféricos), *swab* de escara,

[2] Procedimentos não propagadores de rickettsia podem ser realizados em laboratórios de nível de segurança dois.

líquidos estéreis (como liquor) e material obtido por biópsia ou necropsia (GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005; STENOS; GRAVES; UNSWORTH, 2005).

Por serem de bactérias intracelulares obrigatórias, são cocultivadas em culturas celulares suscetíveis especiais. Diversas linhagens podem ser usadas, porém células Vero são as mais comuns. O isolamento é potencializado, utilizando-se *shell vial* (PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017; RICHARDS, 2012).

A amplificação de ácido nucléico (DNA) rickettsial por PCR é um teste mais rápido, ainda que haja grande variação na sensibilidade e acurácia de acordo com as variantes metodológicas e espécime clínico usados. Sua aplicação clínica iniciou em 1989 (CHAPMAN; BAKKEN; FOLK; PADDOCK *et al.*, 2006; RICHARDS, 2012). Podem ser usados sangue (total, soro, coágulo, nata leucocitária), fragmentos de pele ou outros tecidos (obtidos por biópsia ou necropsia, estando a fresco[3], congelados, fixados em formalina ou parafinados), líquor, líquido pleural, exsudatos, raspado do local de picada e crosta de escara, carrapatos e outros artrópodos, etc. (OTEO; NAVA; SOUSA; MATTAR *et al.*, 2014) (PARIS; BLACKSELL; STENOS; GRAVES *et al.*, 2008; RICHARDS, 2012). Sua sensibilidade é maior entre o primeiro e o quinto dia de sintomas, em especial no sangue, pois coincide com o período de rickettsemia, mas possivelmente até sétimo ou décimo dia, ou enquanto houver escaras nas rickettsioses com esta manifestação. A sensibilidade sofre influência do uso de antimicrobianos, por isso amostras devem ser obtidas antes do início ou no máximo até 24 horas após. É influenciada também pela gravidade clínica, pois quanto maior a intensidade e extensão da lesão endotelial vascular, maior a probabilidade de detecção de DNA bacteriano, inclusive em amostras periféricas como sangue e seus produtos (PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017).

PCR dispensa a espera por soroconversão ou o tempo para cultivar amostras clínicas. Portanto, pode antecipar o diagnóstico e assim influir no prognóstico. Pode ainda ser útil em áreas de alta endemicidade onde níveis prévios de anticorpos na população limitam a sorologia (PARIS; BLACKSELL; STENOS; GRAVES *et al.*, 2008).

O genoma de várias espécies rickettsiais foi amplamente mapeado, permitindo às reações moleculares empregar sequências de diversos genes-alvo, como o gene 16S rRNA (rrs) e outros genes codificadores de proteínas: 17 kDa (hts), citrato sintetase (gltA) e a família autotransportadora, na qual estão as proteínas de

[3] Amostras a fresco permitem além da PCR, realizar cultura e imunohistoquímica.

membrana externa A e B (ompA e ompB) e antígenos de superfície celular csa1 e sca 4 (gene D). Tais genes são úteis na classificação taxonômica. Os mais usados na pesquisa rickettsial em amostras clínicas e vetores são citrato sintetase, ompA, ompB, 16S rRNA e gene D. (ABDAD; ABOU ABDALLAH; FOURNIER; STENOS *et al.*, 2018; GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005; PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017).

Após a amplificação, enzimas de restrição recortam segmentos gênicos, o que pode gerar fragmentos espécie-específicos. Técnicas moleculares têm se tornado cada vez mais automatizadas, inclusive com o sequenciamento nucleotídico direto dos fragmentos, com maior rapidez e precisão na identificação das espécies. Essa identificação é feita pela comparação do *amplicon* sequenciado com sequências presentes em bancos de dados genômicos como o GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005; PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017).

PCR convencional para rickettsia tem sido aplicada com bons resultados em culturas, carrapato e biópsias de escara, sendo mais limitada em amostras de sangue. A técnica convencional *nested* pode aumentar a sensibilidade, inclusive em amostras de sangue, creme leucocitário e plasma, com menor presença de rickettsia. Estudo comparativo de diferentes técnicas de PCR em amostras humanas e de animais, mostrou que a sensibilidade da PCR *nested* para detecção ricketttsial é relacionada não só ao tipo de amostra, mas também ao alvo gênico usado. Amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) tem a vantagem de não requerer termociclador e ser de leitura visual. Porém, não é tão sensível quanto a PCR em tempo real e a *nested* (PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017; RICHARDS, 2012).

PCR *nested* foi o método molecular recomendado pelo CDC para o diagnóstico de GFM em amostras clínicas até recentemente. Os genes alvo mais usados são o codificador da proteína 17-kDa, conservado em todas as espécies, e o ompA. Todavia, essa técnica é demorada, podendo demandar até dois dias, e não tem sensibilidade elevada comprovada em amostras de sangue na fase inicial da doença, exceto em casos graves ou que resultaram em morte. De fato, revisão entre 2000 e 2007 mostrou que só 0,5% dos casos nos EUA de FMMR foram diagnosticados por PCR *nested*. Além disso, essa técnica eleva o risco de contaminação e requer profissionais treinados e salas de laboratório específicas (KATO; CHUNG; ROBINSON; AUSTIN *et al.*, 2013; PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017).

A PCR em tempo real para análise quantitativa de alvos gênicos é amplamente empregada no diagnóstico de infecções, sendo cada vez mais usada no diagnóstico clínico de rickettsioses nos EUA e na Europa. Ela possui alta capacidade analítica, comparada à PCR convencional, menor risco de contaminação por eliminar processos pós-PCR (como eletroforese em gel) e menor subjetividade na leitura dos resultados, já que a detecção dos fragmentos amplificados se processa enquanto a reação é feita e é analisada por aplicativos de computador. Por monitorar a cinética da reação em tempo real, permite determinar o desempenho geral, a especificidade e controle de qualidade da corrida, além de avaliar a estabilidade do controle positivo e a eficiência da extração. A quantificação do DNA amplificado admite comparações entre amostras (ANGELAKIS; RICHET; ROLAIN; LA SCOLA *et al.*, 2012; EREMEEVA; DASCH; SILVERMAN, 2003; KATO; CHUNG; ROBINSON; AUSTIN *et al.*, 2013; RENVOISÉ; ROLAIN; SOCOLOVSCHI; RAOULT, 2012; STENOS; GRAVES; UNSWORTH, 2005).

Eremeeva et al. padronizaram PCR em tempo real, baseada na fluorescência de SYBR Green, avaliada em amostras rickettsiais de cultura celular, em espécimes humanos e de animais e em carrapatos, com eficiência na detecção e quantificação de DNA. Kato et al. publicaram um estudo em 2012 com PCR's para ensaios com TaqMan, usando sequências de um gene panrickettsial e outro para *R. rickettsii*, com sensibilidade significativamente superior à dos protocolos de PCR, inclusive *nested*, recomendados pelo CDC até então nos EUA.

A **Figura 4** esboça a relação temporal entre o curso geral da infecção por rickettsias e os métodos diagnósticos. Nas rickettsioses que cursam com escara de inoculação (barra vermelha), esta pode ser a primeira amostra para diagnóstico usando métodos diretos em biópsia ou *swab*. Porém, a lesão, ainda que precoce, geralmente é indolor e passa desapercebida, só sendo notada quando surgem outros sintomas (barra azul escuro) e hemoculturas podem ser coletadas. Aparecimento de *rash* (barra azul claro), frequentemente entre o terceiro e quinto dia, permite que a pele seja biopsiada, durando entre cinco a oito dias. A pesquisa de anticorpos exige amostras das fases aguda e de convalescença (RICHARDS, 2012).

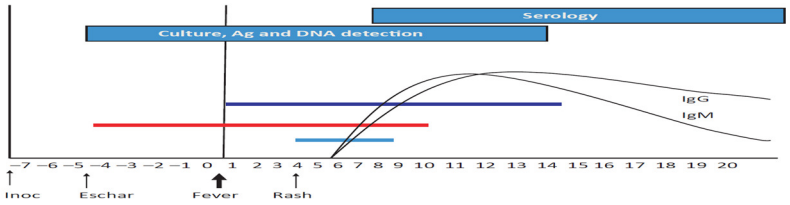

Figura 3: Curso da infecção por rickettsias e métodos diagnósticos (FONTE: RICHARDS, 2012)

2. JUSTIFICATIVA

A situação das rickettsioses no Brasil ainda é pouco conhecida, pois são doenças negligenciadas, que se comportam como emergentes e reemergentes em diversas regiões. São subdiagnosticadas, pela superposição de suas manifestações clínicas com outras doenças, especialmente Síndromes Febris Agudas Exantemáticas e Hemorrágicas; pelo fato de muitos profissionais de saúde estarem pouco familiarizados; e pela insuficiência recursos diagnósticos sensíveis e específicos. Os métodos tradicionais (sorológicos, histopatológicos e de cultivo celular) apresentam limitações, são pouco acessíveis e geralmente só estabelecem o diagnóstico retrospectivamente. Novos métodos são necessários para permitirem o diagnóstico no período de atividade das rickettsioses e, assim, auxiliar na tomada de decisões clínicas que possam interferir no prognóstico, em particular de pacientes com quadros graves, como ocorre com a FMB.

Os métodos moleculares, como a PCR, podem ser usados precocemente no curso da doença, são de rápida execução e podem ser sensíveis e específicos e assim contribuir para o diagnóstico clínico de pacientes. Tais métodos podem ainda identificar DNA rickettsial em artrópodos e vertebrados, o que pode aprofundar o conhecimento epidemiológico das rickettsioses, caracterizando as espécies, sua distribuição, vetores e reservatórios envolvidos.

FMB já foi diagnosticada na região de Ribeirão Preto. Esta região tem visto aumento da população de capivaras e infestações frequentes de carrapatos em áreas urbanas. Portanto, é necessário padronizar técnicas baseadas na amplificação do DNA rickettsial, que possam diagnosticar casos suspeitos de rickettsioses e pesquisar rickettsias em carrapatos coletados. O presente estudo pretende dessa maneira contribuir para a compreensão epidemiológica das rickettsioses nesta região do Estado de São Paulo.

3. OBJETIVOS

Esta Tese teve como objetivo estudar a ocorrência de rickettsioses, em especial da FMB, na região de Ribeirão Preto, utilizando testes de amplificação de DNA (PCR). Foram objetivos específicos:

- Padronizar uma PCR convencional panrickettsial para detecção genômica de *Rickettsia* sp.;

- Padronizar uma PCR em tempo real panrickettsial para detecção genômica de *Rickettsia* sp.;

- Pesquisar DNA rickettsial por PCR em casos febris agudos atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC FMRP USP) e na região de Ribeirão Preto;

- Pesquisar por DNA rickettsial em carrapatos utilizando PCR;

- Identificar a espécie de rickettsia eventualmente detectada por sequenciamento nucleotídico dos produtos amplificados na PCR.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado na região de Ribeirão Preto/SP, sendo os procedimentos de laboratório feitos no Centro de Pesquisa em Virologia (CPV) da FMRP-USP.

4.1. Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética da FMRP-USP através do parecer de número 1.409.200. Todas as informações de identificação dos pacientes foram mantidas sob sigilo. Não há conflitos de interesses entre os participantes deste estudo.

4.2. Seleção de pacientes

Foram incluídos no estudo 35 pacientes com suspeita clínica de FMB, estabelecida por seu médico assistente, atendidos no HC-FMRP-USP ou em outros estabelecimentos de saúde de Ribeirão Preto e de cidades da região, públicos e privados. A participação no projeto se deu através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (anexo IV). Estes pacientes foram selecionados entre setembro de 2016 e junho de 2020.

Dados epidemiológicos e clínicos dos pacientes com suspeita de FMB foram obtidos com um questionário (anexo V), em entrevistas com os mesmos e/ou seus familiares, com seus médicos assistentes e, quando possível, por revisão de prontuários médicos.

Para a maioria dos casos, uma amostra de 10 ml de sangue foi obtida, com antissepsia local, por punção venosa, em um tubo de coleta a vácuo sem anticoagulante e preferencialmente sem gel separador. Tais amostras foram deixadas em repouso e, após a formação e retração do coágulo, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rotações por minuto (rpm) em temperatura ambiente, para separação completa entre o soro e o coágulo. Alíquotas de soro e coágulo foram então separadas e armazenadas. Tanto o soro como o coágulo obtidos de cada paciente foram utilizados para comparação diagnóstica entre os mesmos. Quatro pacientes

tiveram mais de uma amostra de sangue colhida em mais de uma ocasião durante a evolução clínica, com intervalo de um a três dias entre as coletas. Todas foram processadas individualmente, conforme descrição supracitada.

Em cinco casos, amostras de soro foram entregues em tubos estéreis no CPV para processamento. Para 13 pacientes, amostras de sangue total em tubo com anticoagulante foram encaminhadas, juntamente com amostras de sangue sem anticoagulante. Tais amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm em 4ºC, o sobrenadante (plasma) e creme leucocitário obtido foi então separado e armazenado.

Amostras do líquor de três pacientes em tubos estéreis juntamente com amostras de sangue foram obtidas e armazenadas. Para um paciente, além da amostra de sangue, um fragmento cutâneo obtido por biópsia e imerso em formalina foi incluído no estudo. Em um caso fatal, para o qual não possível a coleta de sangue, foram disponibilizados fragmentos de tecido (pulmão, fígado e cérebro), obtidos durante necropsia e armazenados em formalina. Para outro caso, além de amostras de sangue, obteve-se um carrapato, imerso em álcool a 70%, o qual foi descrito na seção correspondente.

À exceção das amostras de tecido trazidas em formalina, todas as amostras de outros serviços foram mantidas sob refrigeração a temperaturas entre 4 e 8º C por até 24 horas, da coleta até serem transportadas em isopor com gelo ao CPV.

Todas as amostras foram devidamente identificadas e armazenadas em caixas apropriadas, sendo mantidas em congelador a - 20º C, até o processamento (OTEO; NAVA; SOUSA; MATTAR *et al.*, 2014; PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017).

A partir dos 35 pacientes, foram obtidas 90 amostras, como mostra a **tabela 4**.

Tabela 4: Amostras de 35 pacientes com suspeita clínica de FMB, no período de setembro de 2016 a junho de 2020.

Material	Número	Observações
Soro	38	De 34 pacientes, dos quais quatro com uma segunda amostra de soro.
Coágulo	32	De 29 pacientes, dos quais três com uma segunda amostra de coágulo.
Plasma rico em leucócitos	13	De 13 pacientes.
Líquor	3	De três pacientes.
Tecido	4	De dois pacientes.
Total	90	35 pacientes.

4.3. Comparação com testes realizados pelo IAL/SP

Pesquisa de anticorpos por IFI realizada pelo IAL/SP, nas amostras dos casos suspeitos de FMB, foi considerada para a comparação com os resultados da PCR's feitas neste estudo. Para tanto, solicitava-se à equipe médica assistente dos casos suspeitos de FMB a coleta de duas amostras pareadas de sangue, com intervalo de duas a três semanas entre as mesmas, para serem encaminhadas ao IAL/SP. Em especial, solicitou-se a coleta da segunda amostra de sangue, inclusive aos próprios pacientes e familiares, quando possível.

4.4 Amostras provenientes de Soroteca

Além das amostras obtidas dos 35 pacientes, como descrito acima, foram também analisadas 255 amostras de soro previamente estocadas a - 20º C no CPV, oriundas de casos de síndromes febris agudas, para os quais arboviroses foram descartadas laboratorialmente, conforme discriminado abaixo:

- 198 amostras do professor Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo:
  - Biorrepositório da pesquisadora Angélica Silva: 66 amostras testadas negativas por PCR para flavivirus e zika e para pesquisa de anticorpos contra dengue e chikungunya;
  - Biorrepositório das pesquisadoras Dra. Aline Lavado Tolardo e Dra. Marília Farignoli Romeiro: 132 amostras testadas negativas por PCR para vesiculovírus, flavivírus e alphavírus;
- 57 amostras gentilmente disponibilizadas pelo professor Dr. Benedito Antônio Lopes Fonseca, negativas por PCR e/ou sorologia para dengue.

  Não há informações clínico-epidemiológicas disponíveis sobre tais amostras.

4.5. Carrapatos

Carrapatos em vida livre foram coletados para o presente projeto, conforme descrição abaixo. Ainda, foram analisados carrapatos previamente coletados, identificados quanto ao gênero e estocados a - 80º C no laboratório do professor Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo do CPV.

Há, por fim, um único espécime de carrapato que foi encontrado aderido à pele de uma paciente e que foi encaminhado em frasco com álcool a 70% juntamente com

amostras de sangue da mesma. Este carrapato foi identificado, lavado e armazenado em PBS estéril a - 80º C até o seu processamento.

4.5.1. Carrapatos coletados:

As coletas de carrapatos para este estudo foram feitas pelo aluno pesquisador e equipe de apoio do CPV, entre setembro e dezembro de 2018, em áreas municipais sabidamente com circulação de capivaras, conforme informação do Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto (anexo VI).

Para a coleta de carrapatos, utilizou-se principalmente a técnica de montagem de armadilhas de retalhos flanela branca (aproximadamente 1,0 x1,0 m) contendo gelo seco (CO_2) ou captura por arrasto de flanela branca, em pequenas adaptações aos métodos descritos no Manual de Vigilância Acarológica da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) de SP (VIEIRA; SOUZA; LABRUNA; MAYO *et al.*, 2002). Foram colocados 500 g de gelo seco em cada armadilha de CO_2, que permaneceu montada por aproximadamente duas horas. O uso de armadilha com CO_2 possibilitou recolher uma quantidade superior de artrópodos em comparação à técnica de arrasto.

As coletas foram feitas nos seguintes locais:

- Local A: área de mata do Hospital Estadual Santa Tereza, pela manhã, em dia ensolarado (quatro armadilhas + arrasto);
- Local B: lago do campus da USP/RP pela manhã, em dia ensolarado (três armadilhas + arrasto);
- Local C: lago no Jardim Olhos D'água, pela manhã e tarde, em dia ensolarado (oito armadilhas + arrasto);
- Local D: margens do Córrego Ribeirão Preto, na Via Norte, pela manhã e tarde, após chuva (cinco armadilhas);
- Local E: córrego próximo à avenida Adelmo Perdizza e Anel Viário, pela manhã, em dia ensolarado (quatro armadilhas);
- Local F: área entre as avenidas Independência, Caramuru e Professor João Fíusa, no bairro Alto da Boa Vista, pela manhã, em dia nublado (quatro armadilhas);
- Local G: parque Maurílio Biagi pela manhã e tarde, em dia ensolarado (seis armadilhas);

- Local H: córrego Laureano, Vila Virgínia, pela manhã e tarde, em dia ensolarado (três armadilhas).

As coletas foram feitas em locais onde capivaras foram vistas a descansar em margens de corpos d'água, ou onde deixaram trilhas e excrementos. Alguns exemplos de armadilhas de CO_2 montadas são mostrados na **figura 4**.

Figura 4: Imagens de coleta de carrapato no município de Ribeirão Preto.
Nas fotos, são registradas capivaras e seu excrementos, bem como exemplos de armadilhas montadas.

Logo após serem capturados, os carrapatos foram colocados em frascos contendo álcool etílico a 70%, rotulados por local e data da coleta. Os frascos foram levados ao laboratório no CPV, onde foram armazenados a - 80º C até a identificação (PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017).

Ao todo, foram coletados 978 indivíduos, todos de vida livre, nos pontos de coleta. Os locais F e H não resultaram na coleta de nenhum espécime. O número e a identificação dos carrapatos em cada local estão descritos na **tabela 15**.

4.5.2. Identificação dos carrapatos coletados

A identificação das espécies de carrapatos capturados foi feita utilizando chaves de identificação, para animais adultos (BARROS-BATTESTI; ARZUA; BECHARA, 2006; VIEIRA; SOUZA; LABRUNA; MAYO *et al.*, 2002) e para larvas e ninfas (MARTINS; ONOFRIO; BARROS-BATTESTI; LABRUNA, 2010).

A identificação foi feita utilizando microscópio óptico Olympus CK2 (objetivas de 04, 10, 20x), para ninfas; e a lupa Zeiss Stemi DRC, para adultos.

Após identificação, os carrapatos foram lavados em PBS estéril. Separados por local de coleta e identificação, adultos foram colocados em tubos individuais e larvas

e ninfas em *pools* de até 20 indivíduos por tubo, produzindo um total de 69 tubos. Estes foram deixados então 30 minutos em banho seco a 60º C, com a tampa aberta para completa evaporação do álcool. A seguir, em cada tubo foram colocados 200 µl de PBS estéril e uma *bead*, para o processo de extração de DNA.

4.5.3. Carrapatos previamente estocados

Foram também analisados no presente trabalho 654 carrapatos previamente coletados na cidade de Ribeirão Preto e estocados a - 80º C. Esses carrapatos eram de vida livre ou foram coletados parasitando uma capivara atropelada. Os espécimes foram obtidos e identificados em nível genérico pelo Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto em 2014. Tais animais foram utilizados em projeto anterior que pesquisou infecção por flavivírus e alphavírus, através de PCR, com resultado negativo. Os carrapatos estavam distribuídos em 19 *pools*, conforme o gênero e local de coleta. Destes, 10 *pools* eram constituídos por espécimes do gênero *Rhipicephalus* e nove *pools* com espécimes de *Amblyomma*. Tais informações estão discriminadas nas **tabelas 16** e **17**, respectivamente.

4.5.4. Processamento dos carrapatos

Os tubos contendo carrapatos coletados e previamente armazenados foram homogeneizados no TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Alemanha), por 40 minutos a 30 Hz. Espécimes adultos, processados individualmente, foram previamente fragmentados utilizando uma ponteira de ponta romba. Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos, a 4ºC, e o sobrenadante de cada frasco armazenado para a etapa de extração de ácidos nucleicos.

4.6. Soro de animais vertebrados

Foram analisadas amostras do soro de 48 animais coletados em Ribeirão Preto, entre 2012 e 2013, pelo pesquisador Dr. Gilberto Sabino-Santos Junior. Essas amostras estavam estocadas a - 80º C e eram provenientes das espécies descritas na **tabela 5**:

Tabela 5: Espécies de 48 amostras de soro de animais coletados em Ribeirão Preto/SP entre 2012 e 2013.

Espécie	Nome popular	Número
Didelphis albiventris	Gambá de orelha branca	36
Dasyprocta azarae	Cutia	10
Rattus rattus	Rato preto	01
Oligoryzomys nigripes	Rato do arroz	01
Total	-	48

4.7. Extração de DNA das amostras

O DNA das amostras clínicas, de animais e de carrapatos foi extraído utilizando o *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, USA), escolhido pela rapidez, reprodutibilidade e qualidade da extração de DNA (PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017). Para amostras contendo soro, plasma com leucócitos e líquor foi usado o protocolo de extração a partir de sangue animal com hemácias não nucleadas. Para as amostras de tecido, coágulo e carrapatos foi usado o protocolo para extração de tecido animal. Recomendações do fabricante foram seguidas, com pequenas adaptações como descritas no protocolo abaixo:

Para amostras de soro, plasma rico em leucócitos e líquor, o volume inicial de 200 µl foi centrifugado por 30 minutos a 10000 rpm em temperatura ambiente, em microtubo estéril de 2,0 ml. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado obtido de cada amostra foi ressuspenso em 200 µl PBS estéril. Das amostras de tecidos e coágulo, foram utilizados fragmentos com cerca de 25 g, cortados em pequenos pedaços para otimizar a lise. Na sequência, os lisados foram colocados em microtubo estéril de 2,0 ml, contendo 180 µl da solução tampão ATL. Das amostras de carrapatos previamente processados, após rápida homogeneização (vortex por 15 segundos), 100 µl foram colocados em microtubo estéril de 2,0 ml, contendo 180 µl de ATL.

Adicionou-se a todas as amostras 20 µl de proteinase K (com atividade de 600 mAU/ml). Nas amostras de soro, plasma rico em leucócitos e líquor, somou-se 200 µl de solução tampão AL.

Todos os tubos tiveram então seu o conteúdo agitado por 15 segundos e centrifugado por outros 15 segundos (*spinning*), sendo a seguir incubados a 56º C. As amostras de soro, plasma rico em leucócitos e líquor foram incubadas por 10 minutos. Quanto às amostras de tecido, coágulo e carrapatos, estas foram incubadas por um período de três a cinco horas, sendo periodicamente agitadas por 15 segundos, até a lise completa do material. A seguir, cada tubo de amostra de tecido, coágulo e

carrapatos recebeu 200 µl de AL e foi agitado por 15 segundos e centrifugado por outros 15 segundos.

Ao final, todas as amostras receberam 200 µl de etanol absoluto, para a precipitação de proteínas não digeridas. Os tubos foram agitados e centrifugados rapidamente, conforme descrição acima. A seguir, o conteúdo de cada tubo foi transferido à coluna de purificação devidamente identificada e todos os novos tubos foram centrifugados a 8000 rpm por um minuto. Cada coluna foi colocada em um novo tubo coletor e 500 µl da solução tampão AW1 foram acrescentados à mesma. Os tubos foram centrifugados a 8000 rpm por um minuto, sendo os tubos coletores e seu conteúdo descartados. Novos tubos coletores foram acoplados a cada coluna e desta vez 500 µl de AW2 adicicionados. Os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por três minutos, tendo mais uma vez os tubos coletores e seu conteúdo descartados. Finalmente, para eluição, cada coluna de purificação foi colocada em um tubo estéril de 2,0 ml e recebeu 150 µl da solução tampão AE. As amostras foram incubadas por um minuto a temperatura ambiente e a seguir centrifugadas a 8000 rpm por um minuto. Os produtos da extração de todas as amostras foram armazenados em *freezer* a - 20º C, até a sua utilização.

Todo experimento de extração de DNA contou com um controle de extração (CE), como controle negativo, para o qual, como volume inicial se usou 180 µl de ATL, seguindo com o protocolo de extração para amostras de soro, plasma rico em leucócitos e líquor, conforme a descrição acima.

Deste ponto adiante, o termo amostra passa a se referir ao produto de DNA extraído, exceto se explicitado de outra maneira.

4.8. Extração e padronização do controle positivo

Nos protocolos de PCR para rickettsias foi usado como controle positivo amostra de *Rickttesia amblyommatis*, gentilmente fornecida pelo professor Dr. Marcelo B. Labruna, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. Essa rickettsia foi mantida em cultura de células Vero. Até o presente momento, essa espécie é considerada não patogênica aos seres humanos.

Foram avaliados os seguintes métodos de extração de DNA de *R. amblyommatis*: para bacilos gram-negativos, cultura de células e tecido, conforme

descrição do fabricante. O volume inicial usado foi 200 µl do estoque em cultura celular. Esse volume foi centrifugado por 10 minutos a 7500 rpm. Os produtos extraídos a partir de cada protocolo de extração foram submetidos à PCR convencional CS1, de acordo com técnica descrita abaixo. Os *amplicons* resultantes foram aplicados em gel de agarose a 1,5%, submetido a eletroforese e analisado em transiluminação UV. Todos os três protocolos de extração analisados mostraram presença de genoma alvo para rickettsia, sem diferença visual entre os mesmos (**Figura 5**).

A partir daí, toda a extração necessária de controle positivo foi feita utilizando-se o protocolo de extração de cultura de células, seguindo os passos supra descritos a partir da adição de proteinase K.

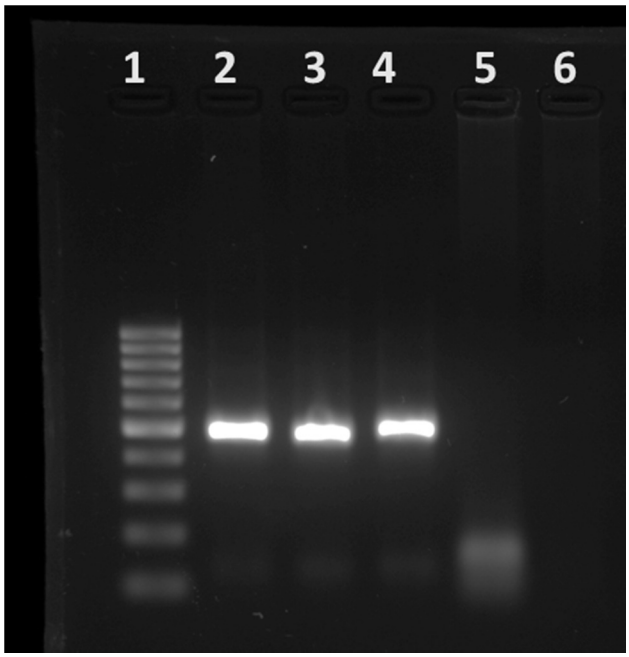

Figura 5: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. Padronização de PCR convencional para *Rickettsia* sp. conforme técnica de extração.
1 – Marcador de 100 pb, **2** – Baciclos Gram-negativos, **3** – Cultura de células, **4** – Tecido, **5** – Controle Negativo

Em seguida, para otimizar a reação, foram avaliadas as temperaturas de anelamento de 46, 48 e 50ºC, com diferentes concentrações dos *primers* (10 e 20 picomol/µl). As diferentes temperaturas e concentrações dos *primers* permitiram a amplificação específica do gene alvo de interesse para identificação do controle positivo (**Figuras 6 e 7**). A partir de então, se padronizou a temperatura de anelamento em 50ºC e a concentração dos *primers* em 10 picomol/µl.

Procedeu-se ainda, a quantificação da concentração de DNA total no produto amplificado pela PCR convencional do controle positivo, utilizado em todas as PCR's, cujo resultado foi de 65,6 ng/❑l.

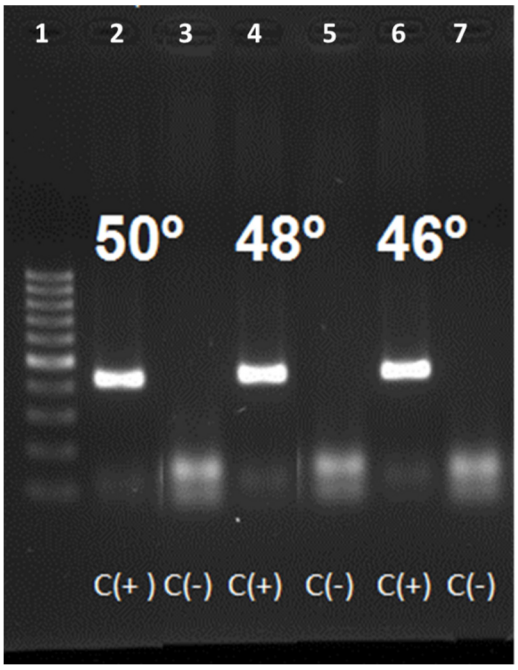

Figura 6: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. Padronização de PCR convencional para *Rickettsia* sp. Concentração de primers 10 picomol/µl com diferentes temperaturas de anelamento
1 – Marcador de 100 pares de base, **2** – Controle positivo com Temperatura de anelamento de 50ºC, **3** – Controle negativo com Temperatura de anelamento de 50ºC, **4** – Controle positivo com Temperatura de anelamento de 48ºC, **5** – Controle negativo com Temperatura de anelamento de 48ºC, **6** – Controle positivo com Temperatura de anelamento de 46ºC, **7** – Controle negativo com Temperatura de anelamento de 48ºC

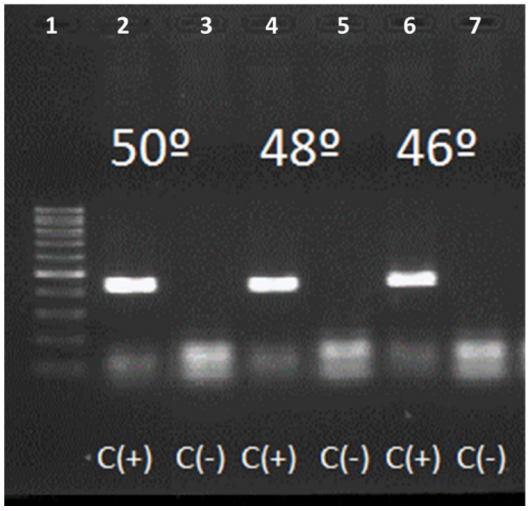

Figura 7: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. Padronização de PCR convencional para *Rickettsia* sp. Concentração de primers 20 picomol/µl com diferentes temperaturas de anelamento

1 – Marcador de 100 pares de base, **2** – Controle positivo com Temperatura de anelamento de 50ºC, **3** – Controle negativo com Temperatura de anelamento de 50ºC, **4** – Controle positivo com Temperatura de anelamento de 48ºC, **5** – Controle negativo com Temperatura de anelamento de 48ºC, **6** – Controle positivo com Temperatura de anelamento de 46ºC, **7** – Controle negativo com Temperatura de anelamento de 48ºC

Por fim, foi feita a titulação do produto amplificado através da PCR convencional do controle positivo, conforme **Figura 8**.

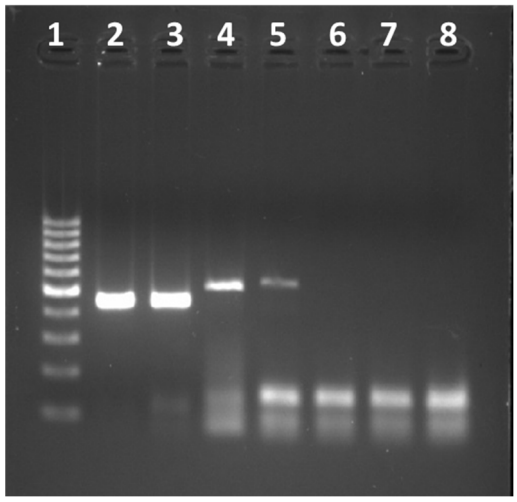

Figura 8: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. Gel apresenta a titulação do controle positivo
1 – Marcador de 100 pares de base, **2** – Controle Positivo, **3** – diluição 3 10^{-1}, **4** – diluição 10^{-2}, **5** – diluição 10^{-3}, **6** – diluição 10^{-4}, **7** – diluição 10^{-5}, **8** – Controle Negativo

4.9. Reações de amplificação gênica

Duas reações principais foram padronizadas para análise das amostras, baseadas no gene alvo gltA: uma PCR convencional (CS1) e outra em tempo real. Como mencionado anteriormente, este gene é o responsável por codificar a enzima citrato sintetase e é um dos mais utilizados para PCR por ser conservado em todas as espécies de rickettsia (LABRUNA; WHITWORTH; HORTA; BOUYER et al., 2004; OTEO; NAVA; SOUSA; MATTAR et al., 2014; PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE et al., 2017). Por ser panrickettsial, pode ser usado como triador para pesquisa do DNA de rickettsias.

Ainda, para avaliar eventuais amostras positivas, foram feitas duas outras reações convencionais, uma para outro alvo do gene gltA (CS2) e outra para ompB. Outra PCR convencional *hemi-nested* para o gene ompA também foi avaliada.

Por fim, para análise da qualidade dos produtos extraídos (controle endógeno), foram feitas PCR convencional para as amostras de carrapatos e uma PCR em tempo real para amostras humanas.

Todas as reações estão descritas abaixo, com a listagem dos *primers* usados na está na **tabela 6.**

4.9.1. PCR convencional (CS1) para *Rickettsia* sp

O par de iniciadores (*primers*) *usado* foi: CS-78 e CS-323 (ver **tabela 6**) o qual permite amplificar 401 pb do gene gltA de rickettsia (CS1).

Para a padronização dessa reação, algumas variáveis foram avaliadas incluindo: o volume de reação, a concentração e volume dos *primers*, o número de ciclagens térmicas e temperatura de anelamento (**figuras 6** e **7**). As reações foram realizadas utilizando-se a solução DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, USA). Após diversos experimentos, foi estabelecido para cada reação um volume total 25 µl, com 2,5 µl de cada amostra a ser testada, sempre incluindo controles positivo e negativo, conforme composição abaixo:

Reagentes:

H_2O…….8,0 ul
DreamTaq…….12,5 ul
CS-78-F…..……1,0 ul (10,0 picomol/ul)
CS-323-R.....….1,0 ul (10,0 picomol/ul)

O termociclador utilizado foi o Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler (Life Technologies, USA). As seguintes condições foram estabelecidas:

Desnaturação inicial: 3 min a 95ºC
Desnaturação: 15 s a 95ºC
Anelamento: 30 s a 50ºC — 40 ciclos
Extensão: 30 s a 72ºC
Extensão final: 7 min a72ºC

A seguir, 6,0 µl do produto da PCR foi separado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e examinado por transiluminação em UV. Fotografias dos géis contendo as bandas fluorescentes de DNA amplificado foram obtidas.

O gel foi preparado a partir de solução TAE 1X, acrescida de agarose na concentração correspondente ao volume utilizado. A seguir essa solução foi fundida por aquecimento em forno micro-ondas e deixada esfriar com o pente de poços necessário. Quando solidificado, o gel foi colocado em uma cuba de eletroforese e coberto com solução de TAE 1X. Em cada poço pipetou-se uma solução composta por 2,0 µl de corante fluorescente para ácidos nucleicos na diluição 1/1000 (gelRed, Biotium, EUA) e 6,0 µl de cada amostra, incluindo os controles positivo e negativo. Em um outro poço, além de 2,0 µl de gelRed, adicionaram-se 2,0 µl do marcador de PM do DNA (*ladder*) 100 kb e 2,0 µl da solução tampão de corrida (*loading buffer*). A mistura em todos os poços foi homogeneizada e a eletroforese ajustada para 90 a 100 volts em tempo de corrida entre 40 a 60 minutos.

4.9.2. PCR em tempo real para *Rickettsia* sp.

Para essa reação, foram utilizados os iniciadores CS-5 e CS-6, que permitem amplificar um fragmento de 147 pb do gene gltA de rickettsia. Esse teste permite detectar sinal de amplificação de todas as espécies do gênero *Rickettsia*, incluindo, dentre outras, *R. rickettsii, R prowazekii, R canadensis, R. akari, R. felis, R. montanesis* e *R. sibirica*. A sensibilidade esperada é de uma cópia de DNA para *R. rickettsii* e 100 cópias para *R. bellii* (LABRUNA; WHITWORTH; HORTA; BOUYER *et al.*, 2004; REGNERY; SPRUILL; PLIKAYTIS, 1991).

A PCR em tempo real usou o sistema de sondas fluorescentes *TaqMan®*, com o Kit IQ Supermix (Bio-Rad) e o equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems, USA). A sonda foi marcada na região 5´ terminal com a molécula sinalizadora 6-carboxifluoresceína (FAM) e na região 3´terminal com *Blackhole Quencher* 1 (BHQ1). A sequência do par de *primers* está na **Tabela 6**.

Para a padronização, algumas variáveis foram avaliadas, incluindo o volume de reação, a concentração e volume dos *primers* e o número de ciclagens térmicas. Para um volume da mistura final de 20 µl, foram utilizados 5,0 µl de cada amostra pós extração de DNA a ser testada e dos controles de extração, positivo e negativo, além dos seguintes reagentes:

Reagentes:

H_2O…….9,9 ul

Master Mix..……...4,0 ul
C5-F…..…...….....0,4 ul (10,0 picomol/ul)
C6-R.....…....0,4 ul (10,0 picomol/ul)
sonda……..0,3 ul (checar concentração)

As condições de ciclagem estabelecidas foram:

Desnaturação inicial: 15 min a 95ºC
Desnaturação: } 15 sec a 95ºC
An./Extensão: } 60 sec a 60ºC 45 ciclos

Todas as reações foram realizadas em duplicata, em placas de 96 poços MicroAmp (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Os resultados finais foram analisados com o programa *StepOne 2.1* (Applied Biosystems, Foster City, EUA). *Amplicons* obtidos durante a padronização da técnica foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% para confirmar o tamanho do produto amplificado.

4.9.3. Outras PCR's

Para a confirmação de eventuais amostras positivas pelas PCR's acima descritas, foram padronizadas seguintes PCR's convencionais.

A primeira tendo como gene alvo uma região de 834 pb também do gene gltA (CS2). Os iniciadores estão listados na **tabela 6**. A solução DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, USA) foi usada no preparo da reação. Para um volume final 25 µl, com 2,5 µl de cada amostra ser testada e dos controles positivo e negativo, a composição segue abaixo:

Reagentes:

H_2O…….8,0 ul
DreamTaq…….12,5 ul
CS – 239 F.....……1,0 ul (10,0 picomol/ul)
CS-1069 R.....…1,0 ul (10,0 picomol/ul)

As condições utilizadas no termociclador foram:

Desnaturação inicial: 5 min a 95ºC

Desnaturação:	20 s a 95ºC	
Anelamento:	45 s a 55ºC	40 ciclos
Extensão:	50 s a 72ºC	

Extensão final: 7 min a 72ºC

Para a segunda reação, utilizaram-se iniciadores capazes de amplificar uma região de 660 pb no gene que codifica ompB. Os iniciadores estão dispostos na **tabela 6**. A solução DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, USA) foi usada no preparo da reação. Para um volume final de 25 µl, com 2,5 µl de cada amostra ser testada e dos controles positivo e negativo, a composição segue abaixo:

Reagentes:

H_2O…….8,0 ul

DreamTaq…….12,5 ul

BG1 – 21F.....1,0 ul (10,0 picomol/ul)

BG2 – 20 R.....1,0 ul (10,0 picomol/ul)

As condições utilizadas no termociclador foram:

Desnaturação inicial: 5 min a 95ºC

Desnaturação:	20 s a 95ºC	
Anelamento:	30 s a 48ºC	40 ciclos
Extensão:	60 s a 60ºC	

Extensão final: 10 min a 60ºC

Por fim, foi feita uma PCR *hemi-nested* para o gene ompA. Na primeira fase, foram usados os *primers* 190.70 F (A1) e 190.701 R (A3) que amplificam uma região de 617 pb de gene ompA (ver **tabela 6**). A solução DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, USA) foi usada no preparo da reação. Para um volume final de 25 µl, com 2,5 µl de cada amostra ser testada e dos controles positivo e negativo, a composição segue abaixo:

Reagentes:

H_2O…….8,0 ul

DreamTaq…….12,5 ul

190.70 F (A1) .....1,0 ul (10,0 picomol/ul)
190.701 R (A3).....1,0 ul (10,0 picomol/ul)

As condições utilizadas no termociclador foram:

Desnaturação inicial: 5 min a 95ºC
Desnaturação: 40 s a 95ºC
Anelamento: 30 s a 60ºC 35 ciclos
Extensão: 45 s a 65ºC
Extensão final: 10 min a 72ºC

Na segunda fase da reação, foram utilizados os *primers* 190.70 F (A1) e 190.602 R (A2) que amplificam uma região de 512 pb do gene ompA (ver **tabela 6**). A solução DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, USA) foi usada no preparo da reação. Para um volume final de 25 µl, com 1,0 µl de cada amostra ser testada e dos controles positivo e negativo, a composição segue abaixo:

Reagentes:

H_2O…….9,5 ul
DreamTaq…….12,5 ul
190.70 F (A1) .....1,0 ul (10,0 picomol/ul)
190.602 R (A2).....1,0 ul (10,0 picomol/ul)

As condições utilizadas no termociclador foram:

Desnaturação inicial: 3 min a 95ºC
Desnaturação: 30 s a 95ºC
Anelamento: 30 s a 58ºC 34 ciclos
Extensão: 45 s a 72ºC
Extensão final: 10 min a 72ºC

4.9.4. Controle endógeno das amostras de pacientes

Como controle endógeno dos produtos extraídos de DNA de amostras de pacientes, outro protocolo de PCR em tempo real foi usado. O objetivo dessa reação foi avaliar a qualidade das amostras quanto à recuperação de DNA humano extraído,

considerando a presença de possíveis fatores de inibição da PCR. A integridade do DNA nas amostras clínicas foi avaliada amplificando-se um gene humano constitutivo (RNAse P) como controle interno (FACCINI-MARTÍNEZ; MUÑOZ-LEAL; ACOSTA; DE OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Para controle positivo dessa reação, foi usada amostra do sangue de um voluntário saudável.

Essa reação utilizou sonda *TaqMan®* e o Kit IQ Supermix (Bio-Rad). O par de iniciadores e a sonda estão listados na **tabela 6**. O processamento foi feito no termociclador *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems, EUA). Para um volume de mistura final de 20 µl, foram utilizados 5,0 µl de cada amostra a ser analisada e dos controles positivo e negativo, segundo a composição abaixo:

Reagentes:

H_2O…….9,9 ul
Master Mix..……...4,0 ul
RNAse P F..…….....0,4 ul (10,0 picomol/ul)
RNAse P R.....…….....0,4 ul (10,0 picomol/ul)
sonda……..…..0,3 ul (10,0 picomol/ul)

As condições estabelecidas no termociclador foram:

Desnaturação inicial: 15 min a 95ºC
Desnaturação: } 15 sec a 95ºC
An./Extensão: } 60 sec a 60ºC 45 ciclos

Todas as reações foram realizadas, em duplicata, em placas de 96 poços MicroAmp (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Os resultados finais foram analisados com o programa *StepOne 2.1* (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Todas as amostras de pacientes foram positivas para o controle interno. A **figura 9** é um exemplo de PCR em tempo real do controle endógeno de amostras dos pacientes.

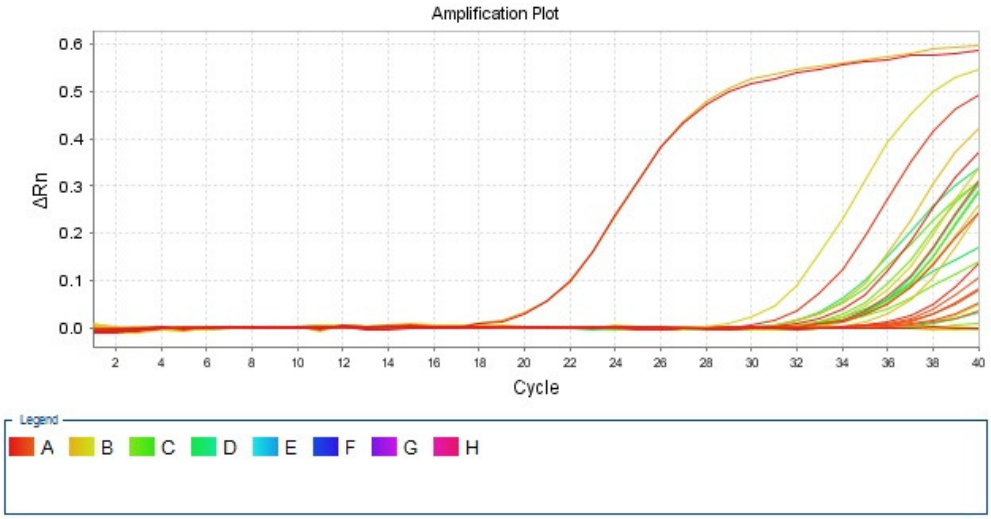

Figura 9: PCR em tempo real para controle endógeno de amostras de pacientes.

4.9.5. Controle endógeno de carrapatos

Para avaliar a presença de DNA viável nas amostras de carrapatos obtidas da extração de DNA, foi feita uma reação convencional de amplificação de região com 460 pb no gene mitocondrial 16S rDNA, presente em carrapatos e ácaros (BLACK; PIESMAN, 1994).

Como controle positivo dessa reação, utilizou-se espécime de *Rhipicephalus sanguineus* previamente estocado no laboratório. Todas as amostras de carrapatos foram positivas por essa PCR. Um exemplo de gel desta reação é mostrada na **figura 10** abaixo.

Os iniciadores para essa reação estão discriminados na **tabela 6**. A solução DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, USA) foi usada para o preparo da reação. Para um volume final 25 µl, com 2,5 µl de cada amostra ser testada e dos controles positivo e negativo, a composição segue abaixo:

Reagentes:

H_2O…….8,0 ul

DreamTaq…….12,5 ul

16 S +1.....……1,0 ul (10,0 picomol/ul)

16 S -1.....….1,0 ul (10,0 picomol/ul)

As condições utilizadas no termociclador foram:

Desnaturação inicial: 3 min a 94ºC

Desnaturação:	30 s a 94ºC	
Anelamento:	30 s a 48ºC	10 ciclos
Extensão:	40 s a 72ºC	
Desnaturação:	30 s a 94ºC	
Anelamento:	30 s a 50ºC	15 ciclos
Extensão:	40 s a 72ºC	
Desnaturação:	30 s a 94ºC	
Anelamento:	30 s a 55ºC	10 ciclos
Extensão:	40 s a 72ºC	

Extensão final: 7 min a 72ºC

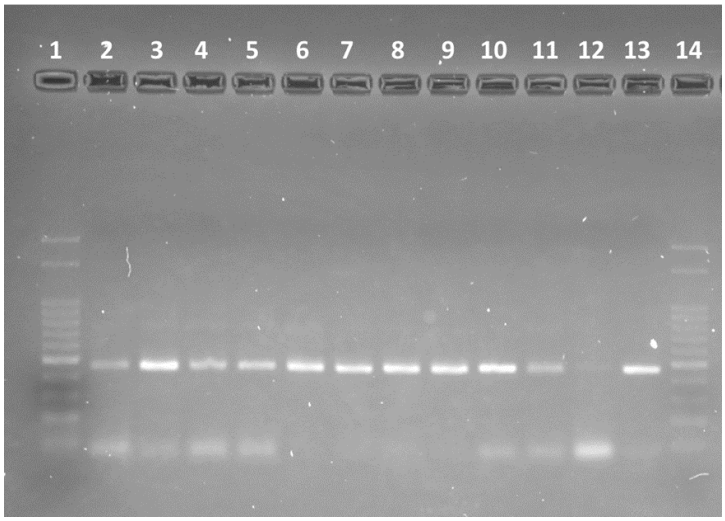

Figura 10: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. Amostras de carrapato **1** – Marcador de 100 pares de base, **2-13** –Amostras de carrapato, **14 –** Marcador de 100 pares de base
Legenda: Número: identificação do tubo com amostra de carrapatos.

Tabela 6: Lista de *primers* e sonda utilizados nos protocolos de PCR convencional e em tempo real, para detecção de *Rickettsia sp* e controles endógenos em amostras do estudo

Nome	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Tamanho (pb)	Fragmento (pb)
CS - 78 F	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	23	401
CS - 323 R	GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT	28	
CS – 239 F	GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT	25	834
CS-1069 R	CAGGGTCTTCGTGCATTTCTT	21	
BG1 – 21F	GGCAATTAATATCGCTGACGG	21	660
BG2 – 20 R	GCATCTGCACTAGCACTTTC	20	
CS-5 F	GAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGAT	27	147
CS-6 R	AGGGTCTTCGTGCATTTCTT	20	
Sonda	6-FAM d(CATTGTGCCATCCAGCCTACGGT) BHQ-1	-	-
RNAse P F	AGATTTGGACCTGCGAGCG	19	65
RNAse P R	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	20	
Sonda Rnase P	6-FAM d(TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG) BHQ-1	-	

16 S +1 **16 S -1**	CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT	29 22	460
190.70 F – A1 **190.602 R – A2**	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT	21 21	512
190.70 F – A1 **190.701 R – A3**	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA GTTCCGTTAATGGCAGCATCT	21 21	617

Água ultrapura, livre de endonucleases, foi utilizada como controle negativo e como componente em todas as reações (convencional e tempo real).

4.10. Sequenciamento de *amplicons*

Produtos eventualmente amplificados em alguma das PCR's convencionais para rickettsias, após a corrida de eletroforese, foram sequenciados. Os *amplicons* obtidos foram excisados do gel de agarose e purificados com o *QIAquick Purification Kit (QIAGEN,* Alemanha). A seguir, seus nucleotídeos foram sequenciados utilizando o *ABI PRISM Big Dye Teminator v3.1 CycleSequencing kit®,* seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Para tanto, foi usado o sequenciador automático 3500 *Series Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*). As sequências parciais de nucleotídeos eventualmente obtidas foram analisadas e comparadas a outras, disponibilizadas pelo *GenBank* (NCBI, EUA), visando a identificar eventual espécie de rickettsia envolvida, com a ferramenta *BLASTn* (NCBI, EUA).

Amostras por ventura positivas na PCR em tempo real para rickettsia também foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, conforme procedimento previamente descrito, exceto pelo acréscimo de 2,0 µl da solução tampão de corrida (*loading buffer*) em todos os poços no gel. A seguir, prosseguiu-se com o protocolo de sequenciamento supramencionado.

4.11. Validação das PCR convencional CS1 e em tempo real

Para validar os protocolos de PCR para pesquisa de rickettsia, foram utilizadas 10 amostras de tecido de cobaias infectadas experimentalmente com *Rickettsia sp.*, sendo seis fragmentos de fígado e quatro de baço, gentilmente cedidas pelo professor Dr. Marcelo B. Labruna, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

As **figuras 11** e **12** mostram o resultado das PCR's para rickettsias convencional CS1 e em tempo real dessas amostras, respectivamente. Na PCR convencional, houve aparecimento de banda correspondente ao fragmento amplificado em seis das 10 amostras (60%). Na PCR em tempo real, 100% das amostras foram positivas.

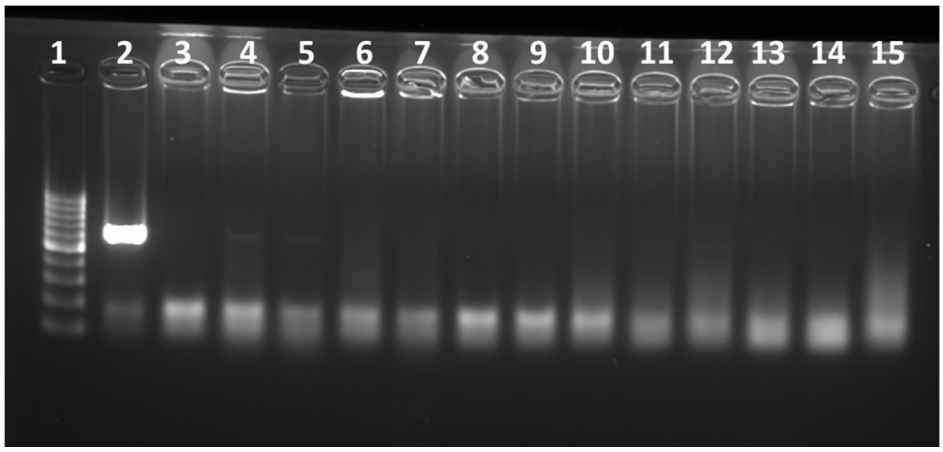

Figura 11: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. Amostras de Cobaias **1** – Marcador de 100 pares de base, **2** – Controle positivo, **3** – Controle Negativo, **4** – Cobaia 1 Fígado, **5** – cobaia 2 fígado, **6** – cobaia 3 baço, **7** – cobaia 3 fígado, **8** – cobaia 4 baço, **9** – cobaia 5 baço, **10** – cobaia 5 fígado, **11** – cobaia 6 fígado, **12** – cobaia 7 fígado, **13** – cobaia 7 baço, **14 –** Controle Negativo, **15 –** Controle de extração

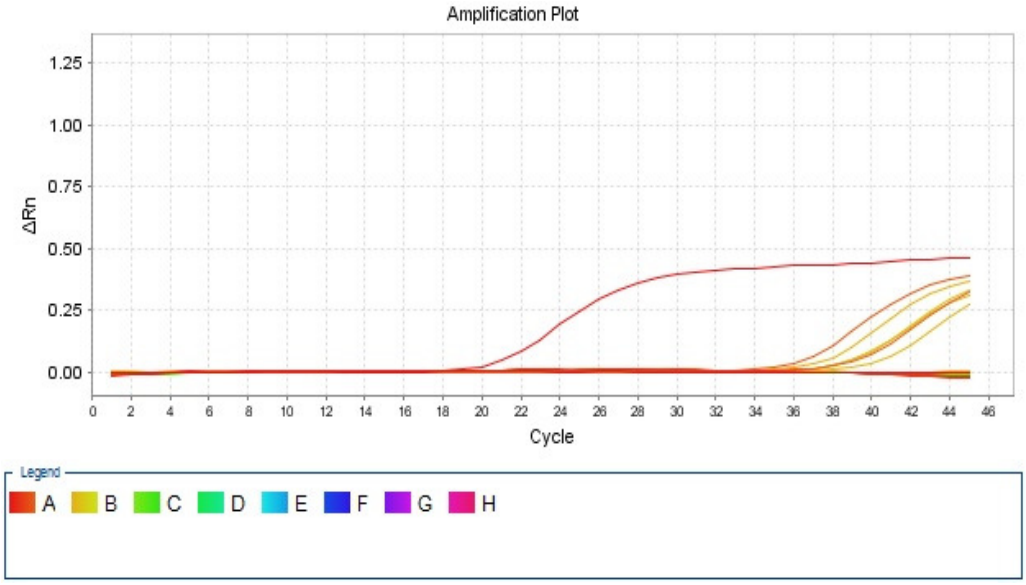

Figura 12: PCR em tempo real para pesquisa de DNA rickettsial em amostras de cobaias infectadas com *Rickettsia sp*.

4.12. Medidas utilizadas para prevenir riscos no Projeto de Pesquisa

O pesquisador manteve-se atento, ao manipular as amostras, tanto de pacientes e animais quanto de carrapatos, uma vez que as mesmas poderiam transmitir doenças infectocontagiosas caso alguma exposição acidental acontecesse. Para proceder à coleta de carrapatos, calçados e vestimentas apropriados, com vedamento com fita adesiva foram usados pelo aluno e equipe de apoio (DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010).

Para os pacientes, o único risco associado ao projeto esteve relacionado à coleta da amostra de sangue periférico, a qual foi realizada com técnicas apropriadas para eliminar tal risco.

Vale ressaltar também como risco deste projeto de pesquisa, a sua dificuldade de realização por abranger técnicas altamente sensíveis e específicas. No entanto, este fato também implica benefício do trabalho, uma vez que o mesmo teve a finalidade de validar ferramentas diagnósticas que poderão ter utilidade clínica e epidemiológica.

4.13. Análise dos resultados

Os resultados obtidos foram analisados por estatística descritiva conforme desenvolvido na seção sequente. Quando necessário e aplicável, foram calculadas medidas de tendência central, como média aritmética com desvio padrão e mediana.

5. RESULTADOS

Neste estudo, utilizando PCR, pesquisou-se por DNA rickettsial em amostras clínicas de pacientes com suspeita de FMB, em amostras de soro estocadas de pacientes com síndrome febril aguda, em carrapatos coletados para este trabalho e também em carrapatos anteriormente armazenados. Ainda, se pesquisou por DNA de rickettsias em amostras de soro de animais vertebrados previamente capturados.

5.1. Características epidemiológicas e clínicas dos 35 pacientes do estudo

No HC FMRP, foram atendidos 26 pacientes e os demais nove pacientes em outros serviços de saúde: seis em instituições particulares, sendo um na cidade de Batatais/SP; e três na rede municipal de Ribeirão Preto, Sertãozinho/SP e São Carlos/SP. As informações obtidas estão dispostas nas **tabelas 7** a **11** e **figuras 13** a **15** abaixo.

A **figura 13** mostra o sexo dos 35 pacientes estudados. Nota-se predomínio do sexo masculino.

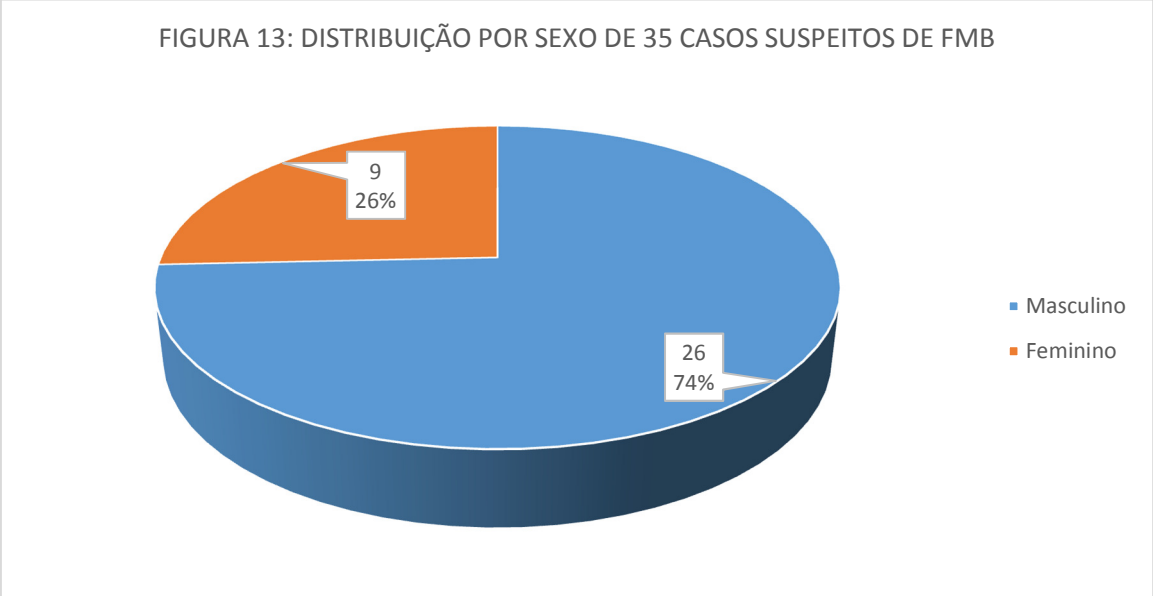

Figura 13: Distribuição por sexo de 35 casos suspeitos de FMB.

A média de idade dos 35 participantes foi 33,3 ± 16,3 anos (M_d = 32,0), variando entre quatro e 62 anos. A **figura 14** exibe a distribuição dos casos por faixa etária.

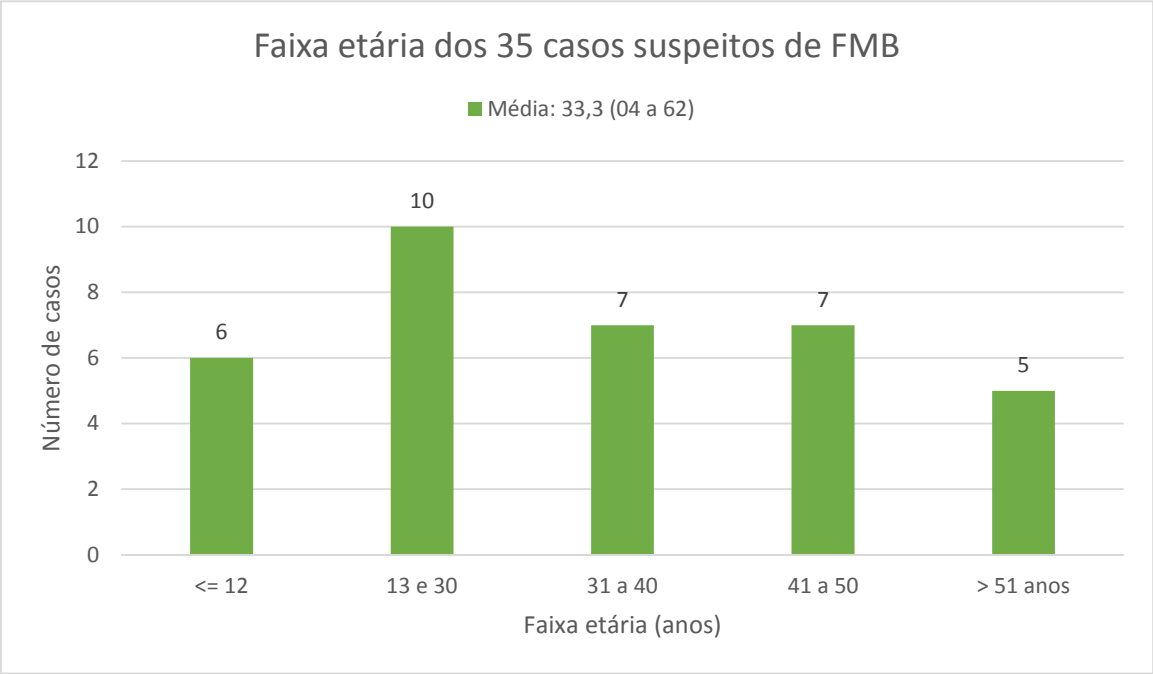

Figura 14: Distribuição dos casos suspeitos de FMB por idade.

Para estimar o eventual risco ocupacional para aquisição de FMB, a ocupação profissional dos participantes foi avaliada. A informação não esteve disponível para um indivíduo, conforme demonstrado na **tabela 7** abaixo.

Tabela 7: Ocupação dos 35 casos suspeitos de FMB.

Ocupação	**Número (%)**
Estudante	08 (22,8)
Área da saúde (auxiliar de enfermagem, biologista, médico)	03 (8.7)
Médico veterinário	02 (5,7)
Lavrador	02 (5,7)
Do lar	02 (5,7)
Profissionais do comércio	03 (8,7)
Advogado	02 (5,7)
Outras (vigia, supervisor, administrador, TI, mecânico, soldado, policial, aposentado, fotógrafo, construção civil, representante de farmacêutica, cabelereiro)	12 (34,2)
Não disponível	01 (2,8)
Total	**35 (100,0)**

A distribuição dos participantes por ano ao longo do estudo mostra dois casos em 2016, seis em 2017, 10 em 2018, 13 em 2019, e quatro em 2020. A ocorrência dos casos suspeitos de FMB foi distribuída por dois períodos sazonais: entre junho e outubro e entre novembro e maio. Estes dados estão mostrados na **figura 15** abaixo.

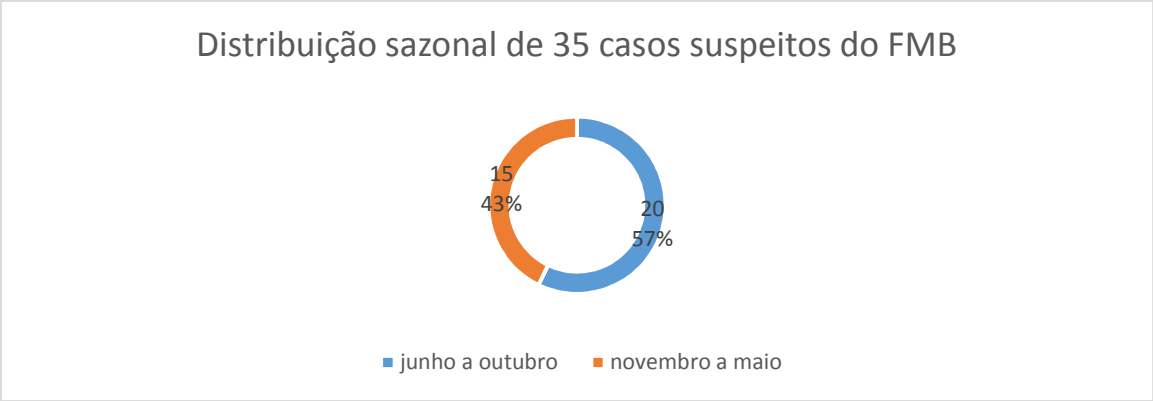

Figura 15: Distribuição sazonal de 35 casos suspeitos do FMB

A **tabela 8** mostra os 35 participantes, segundo os locais de nascimento, de residência atual e de provável infecção (LPI). O LPI foi em área endêmica para FMB do Estado de SP para cinco pacientes. Para outros cinco, LPI foi em outros estados.

Tabela 8: Distribuição de Casos Suspeitos de FMB conforme naturalidade, residência e LPI.

Cidade ou região	Naturalidade	Residência atual	LPI
RP	12	17	09
Região de RP	06 (Batatais: 02, Pontal, São Carlos, Jaboticabal, Sertãozinho)	11 (Jaboticabal: 02, Batatais: 02, Sertãozinho: 02, São Carlos, Pontal, Mococa, Dumont, Cajuru)	12 (Colina: 02, Mococa: 02, Jaboticabal: 02, São Carlos, Cajuru, Barrinha Sertãozinho, Altinópolis, Batatais)
Região de Campinas	04 (Campinas: 02, Itapira, Mogi Guaçu)	04 (Campinas: 02, Itapira, Mogi Guaçu)	03 (Campinas, Itapira, Mogi Guaçu)
Grande SP	03 (SP: 02, SBC)	01 (SBC)	02 (SP, Guarulhos)
Outras, de SP	04 (Ibitinga, Jales, Catanduva, Gal. Salgado)	01 (Borborema)	02 (Borborema, Praia Grande)
Outras, do País	05 (Baixa Grande/BA, Antonina do Norte/CE, Goiânia/GO, Apucarana e Arapongas/PR)	0	05 (Epitaciolândia/AC, Anápolis/GO, MG: Serra da Canastra, Furnas, São João Batista do Glória)
ND	01	01	02
Total	35	35	35

Eventuais exposições de risco para a aquisição de FMB entre os 35 pacientes estudados estão agrupadas na **tabela 9**.

A duração dos sintomas apresentados pelos participantes até a avaliação médica foi, em média, de 7,6 ± 5,4 dias (M_d = 6,0), variando entre três e 30 dias. Essa informação não foi obtida em dois casos. Entre os demais 33 casos, 19 (57,6%) procuraram assistência em período inferior a sete dias após início dos sintomas.

Tabela 9: Exposição ambiental para 35 casos suspeitos de FMB

Exposição	Sim (%)	Não (%)
Visita recente a meio rural (N=30)[1]	21 (70,0)	09 (30,0)
Trabalho rural (N=32)[2]	07 (21,9)	25 (78,1)
Picada de carrapato recente (N=32)[2]	18 (56,3)	14 (43,7)
Visita em área com carrapatos (N=31)[3]	21 (67,7)	10 (32,3)
Carrapatos na residência (N=29)[4]	03 (10,3)	26 (89,7)
Contato próximo a animais (N=14)[5]	11 (78,6)[6]	03 (21,4)

Dados não disponíveis: 1: 05 / 2: 03 / 3: 04 / 4: 06 / 5: 21 casos.
6: Animais: capivaras: 03; cão: 03; cavalos: 02; gato: 01; capivara e cão: 01; capivara e cavalo: 01.

A **tabela 10** lista a frequência dos principais sintomas apresentados pelos pacientes. A tríade febre, cefaleia e *rash* esteve presente em oito (25,0%) dos 32 casos em que foi possível fazer essa associação. Descrição do exantema cutâneo foi feita em apenas três dos 14 casos com *rash*: papular em dois e maculopapular acompanhado de lesões violáceas no outro. Em três pacientes as lesões eram acompanhadas de prurido.

Tabela 10: Principais sintomas de 35 pacientes com suspeita de FMB

Sintoma	Presente (%)	Ausente (%)
Febre (N=32)[1]	29 (90,6)	03 (9,4)
Cefaleia (N=32)[1]	21 (65,6)	11 (34,4)
***Rash* (N=32)[1]**	14 (43,8)	18 (56,2)
Mialgia (N=32)[1]	13 (40,6)	19 (59,4)
Escara (N=30)[2]	04 (13,3)	26 (86,7)

Não disponível: 1 – 03 pacientes; 2 – 05 pacientes.

A frequência de outros sintomas ou sinais clínicos observados nos 35 pacientes é mostrada na **tabela 11**.

Tabela 11: Outras Manifestações clínicas de 35 pacientes suspeitos de FMB

Sintoma / sinal	Frequência (%) N= 30*
Vômitos	09 (30,0)
Náuseas	07 (23,3)
Artralgia	07 (23,3)
Calafrios	06 (20,0)
Hiporexia	05 (16.7)
Dor abdominal	05 (16.7)
Diarreia	05 (16.7)
Icterícia	04 (13,3)
Astenia	03 (10,0)
Manifestações neurológicas (alteração do nível de consciência: 04, parestesias em MMII: 02, convulsões: 02, agitação: 01, rigidez nucal: 01, tontura: 01)	09 (30,0)
Queixas visuais (fotofobia: 02, dor retro-orbitária: 02, hiperemia conjuntival: 01)	05 (16.7)
Adenomegalia regional (sem escara associada)	02 (6,7)
Prurido (sem *rash*)	02 (6,7)
Emagrecimento	02 (6,7)

Sudorese	02 (6,7)
Esplenomegalia, colúria, hipocolia fecal, odinofagia, dor em MMII, tosse seca.	01 (3,3) cada

**Não disponível para cinco pacientes*

Entre os pacientes estudados, a coleta de amostra clínica ocorreu, em média, após 7,8 ± 5,4 dias (M_d = 7,0) da instalação do quadro clínico, variando entre três e 30 dias. Dentre 33 pacientes, a amostra foi obtida até o sétimo dia de sintomas em 19 (57,6%); para 13 (39,4%) pacientes, esse período foi igual ou inferior a cinco dias, e para quatro (12,1%), este tempo foi inferior ou igual a três dias. Em dois casos este dado não estava disponível.

Informações sobre terapia específica estavam disponíveis para 34 dos 35 casos. Tratamento específico para FMB foi prescrito em 24 (70,6%) indivíduos e 10 não o receberam. Os esquemas utilizados incluíram: doxiciclina em 20 (83,3%) participantes; cloranfenicol em um (4,2%) e doxiciclina seguido por cloranfenicol em dois (8,3%) pacientes. O antimicrobiano usado para FMB não foi informado para um dos 24 pacientes tratados.

Terapia para outras doenças, com outras classes de antimicrobianos, corticosteroides sistêmicos ou anti-histamínicos foi usada por 19 (57,6%) pacientes e não foi prescrita para 14 (42,4%). Não houve informação para dois pacientes. Em 15 (45,5%) pacientes, foram usados tanto o tratamento específico como para outras condições. Oito (24,2%) pacientes fizeram uso exclusivo de tratamento específico, ao passo que quatro (12,1%) foram tratados apenas para outras condições. Nenhum tratamento foi prescrito para seis (18,2%) pacientes.

No momento de obtenção da amostra clínica, 24 pacientes não estavam em uso de tratamento específico; seis pacientes já haviam iniciado antimicrobiano para FMB com duração inferior a 24 horas; dois já haviam iniciado a terapia até 48 horas; e dois indivíduos já tinham até seis dias de uso medicamentoso. Entre os que receberam tratamento empírico para FMB, um paciente teve duas amostras coletadas, uma antes e a outra com 48 horas da instituição terapêutica.

Internação hospitalar foi necessária para 20 (58,8%) pacientes. Essa informação não esteve acessível para um indivíduo. Oito (23,5%) pacientes tiveram quadro clínico grave. Óbito foi o desfecho para cinco (14,7%) participantes. A evolução de um caso é desconhecida. Ainda, três (60%) dentre os cinco pacientes que faleceram receberam tratamento específico para FMB.

5.2. Reações de amplificação gênica em amostras

Ao todo, 482 amostras foram analisadas no presente estudo quanto à presença de DNA de rickettsia, utilizando PCR's convencional CS1 e em tempo real. Estas amostras estão assim distribuídas:

- 90 amostras provenientes de 35 pacientes;
- 255 amostras oriundas da soroteca do CPV;
- 89 amostras de carrapatos correspondentes a: um espécime encontrado em uma paciente, 69 tubos de carrapatos coletados e 19 *pools* de carrapatos estocados no laboratório;
- Amostras de soro de 48 animais vertebrados armazenados no laboratório (ver **tabela 5**).

5.3. Amostras dos pacientes participantes

As 90 amostras obtidas dos 35 pacientes arrolados no estudo (**tabela 4**) foram testadas por PCR convencional para o gene gltA (CS1). Em nenhuma, houve amplificação de ácidos nucleicos. A **figura 16** é um exemplo de corrida em gel de agarose com amostras dos pacientes do estudo:

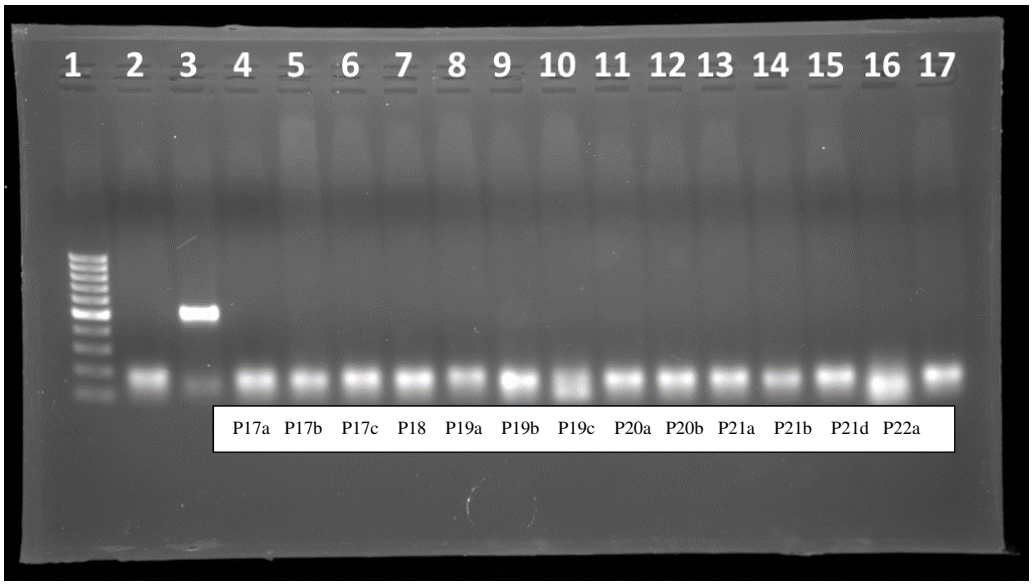

Figura 16: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. Gel apresenta amostras de pacientes com suspeita de FMB

1 – Marcador de 100 pares de base; **2** – Controle negativo, **3** – Controle positivo, **4-16** – Amostras de pacientes com suspeita de FMB, **17** – Controle de extração
Legenda: P: identificação do paciente; a: soro; b: plasma + leucócitos; c: coágulo: d: líquor.

PCR em tempo real também foi feita em todas as amostras. Destas, em duas amostras de soro de dois pacientes, o resultado foi positivo, o que corresponde a 2,2% do total de amostras e a 5,7% dos pacientes. As reações positivas foram reproduzidas e confirmadas por três vezes em duplicata. Amostras de coágulo e plasma desses dois pacientes foram negativas. Uma dessas pacientes, todavia, faleceu por meningococcemia confirmada em hemoculturas, a despeito da antibioticoterapia de amplo espectro utilizada, (inclusive cobertura para rickettsias). A **figura 17** é um exemplo de PCR em tempo real com amostras positivas de soro dos participantes paciente selecionado para o estudo e as duas amostras de soroteca. A CT do controle positivo foi de 20,6 ± 0,2 (M_d = 20,6) e das amostras testadas em média 38,2 ± 0,9 (M_d = 38,4), o que pode representar pequena quantidade de DNA rickettsial nessas amostras.

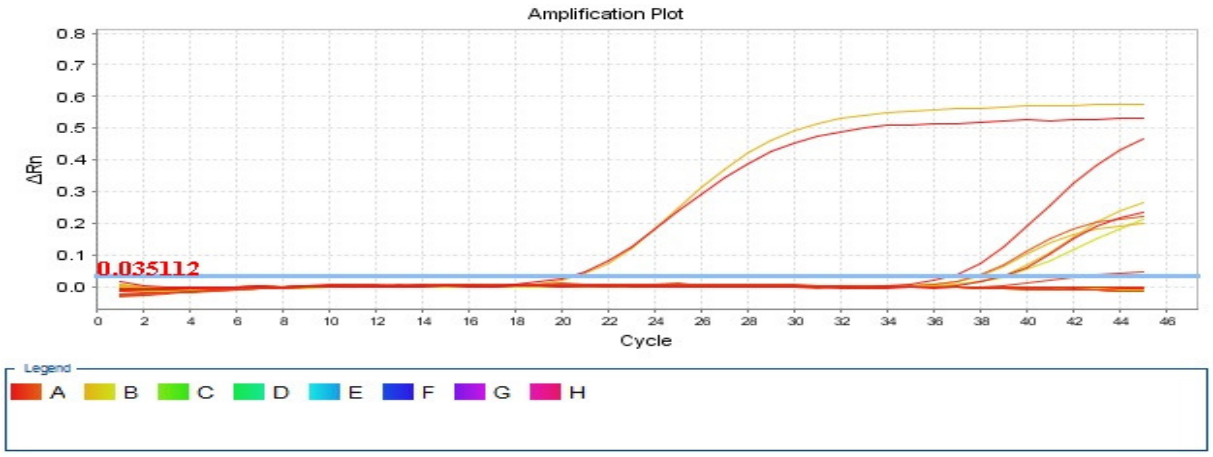

Figura 17: PCR em tempo real para rickettsia em amostras de soro de pacientes.

5.4. Diagnóstico final dos participantes estudados

Exames diagnósticos para FMB foram realizados pelo IAL/SP em 23 dos 35 (65,7%) pacientes e todos resultaram negativos. Destes, 21 representam IFI em amostras pareadas de soro e para os outros dois pacientes, que evoluíram a óbito, foi feita PCR em tempo real em amostra sérica, sendo que para uma paciente foi feita ainda pesquisa de IgM em soro e imuno-histoquímica de fragmentos obtidos por

necropsia, todas com resultado negativo. Para o outro óbito, não foi realizada pesquisa de anticorpos. Dentre os casos com amostras testadas pelo IAL/SP, um paciente possuía reação de Weil Felix positiva. Apenas um dos dois participantes do estudo com PCR em tempo real positiva teve amostra encaminhada ao IAL. Amostras de 12 (34,3%) pacientes não foram analisadas pelo IAL, algumas por não ter segunda amostra de sangue. Dentre estes, os três outros indivíduos que faleceram, inclusive a outra paciente com PCR positiva em tempo real, falecida por meningococcemia. A comparação dos resultados dos testes feitos pelo IAL e as PCR's dos participantes está agrupada na **tabela 12**.

Tabela 12: Comparação entre os resultados de PCR convencional e em tempo real de 35 pacientes com suspeita de FMB, com resultados do IAL/SP.

TÉCNICA/ RESULTADO	POSITIVO (%)	NEGATIVO (%)	NÃO REALIZADO (%)	TOTAL (%)
PCR CONVENCIONAL	0 (0,0)	35 (100,0)	0 (0,0)	35 (100,0)
PCR EM TEMPO REAL	02 (5,7)	33 (94,3)	0 (0,0)	35 (100,0)
IFI / PCR (IAL)	0 (0,0)	23[2] (65,7%)	12 (34,3)	35 (100,0)

[1] Instituto Adolfo Lutz/São Paulo; [2] Para dois casos (óbito), foi feita PCR em tempo real em amostra de sangue *post-mortem*

Dos 35 pacientes que participaram do estudo, 20 receberam diagnósticos específicos que excluíram FMB ao final da investigação clínica. Entre grupos diagnósticos, Doenças Infecciosas foi estabelecido em 10 (31,3%) casos, tais como dengue, salmonelose, leptospirose, faringite bacteriana, EBV, meningococcemia, celulite e sepsis. Doenças autoimunes foram o diagnóstico definitivo de cinco (15,6%) pacientes. Para três indivíduos, o diagnóstico final não foi informado. Doze pacientes não tiveram diagnóstico final definido, permanecendo como "síndrome febril aguda" e meningite de predomínio linfomonuclear (com as principais etiologias virais excluídas). FMB foi laboratorialmente descartada por exames do IAL em oito destes 12 casos. Por conseguinte, FMB permaneceu como hipótese clínica final para quatro participantes. Os diagnósticos finais dos participantes do estudo estão listados na **tabela 13.**

Tabela 13: Diagnóstico final para os 35 casos suspeitos de FMB.

Diagnóstico final	Número (%)
Síndrome febril aguda	10 (28,5)
Dengue	03 (8,5)
Doença reumatoide juvenil	02 (5,6)
Reação alérgica	02 (5,6)

Meningencefalite linfomononuclear	02 (5,6)
Púrpura de Henoch-Schonlein	01 (2,9)
Celulite	01 (2,9)
Edema agudo pulmonar (necropsia)	01 (2,9)
Vasculite primária do SNC	01 (2,9)
Leptospirose	01 (2,9)
Sepsis com síndrome colestática	01 (2,9)
Salmonelose	01 (2,9)
Faringite bacteriana	01 (2,9)
Infecção por EBV	01 (2,9)
Meningococcemia	01 (2,9)
Crise convulsiva com pneumonia aspirativa	01 (2,9)
SIDA + SAAF	01 (2,9)
Hepatite medicamentosa fulminante + SIDA	01 (2,9)
Não disponível	03 (8,5)
Total	35 (100)

Dentre os 24 pacientes que receberam tratamento específico para FMB, 18 (75,0%) tiveram resultado negativo pelo IAL/SP (17 IFI anti-rickettsia, um PCR). O exame não foi realizado em seis outros (25,0%) casos. Inversamente, entre os 23 pacientes que tiveram amostras analisadas pelo IAL/SP, 18 (78,3%) trataram FMB.

5.5. PCR das amostras de soroteca

PCR convencional para o gene gltA (CS1) foi feito nas 255 amostras das três coleções de soro, disponibilizadas para este estudo, de pacientes com síndrome febril aguda. Não houve amplificação de ácidos nucleicos em nenhuma das amostras (**figura 18**).

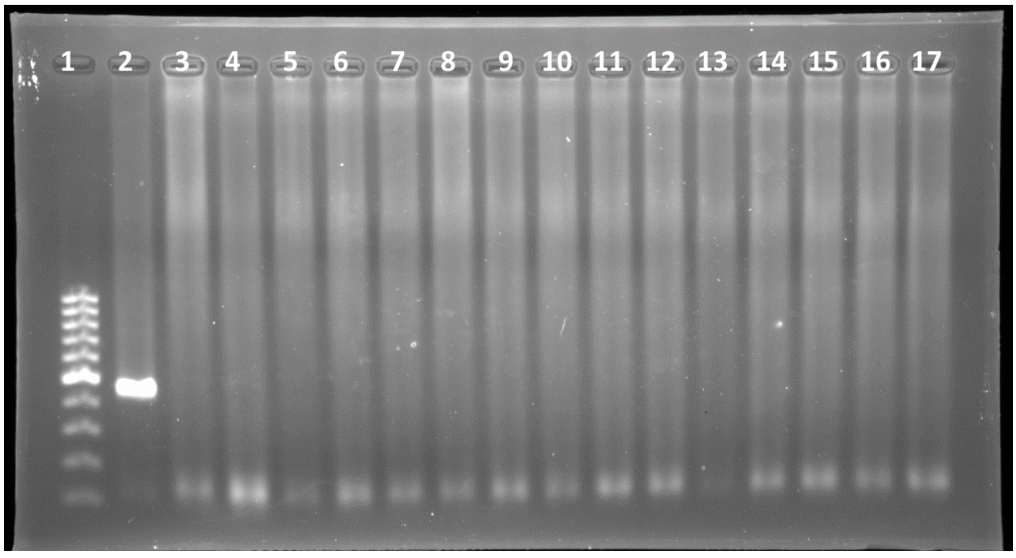

Figura 18: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. Amostras de soro de pacientes com síndrome febril aguda (soroteca).

1 – Marcador de 100 pares de base, **2** – Controle positivo, **3** – Controle negativo, **4 -16** – Soro de paciente, **17** – Controle de Extração
Legenda: Número: identificação do soro do paciente.

Já na PCR em tempo real, duas amostras foram positivas (0,8%). Essas reações positivas foram reproduzidas e confirmadas por três vezes em duplicata. A **figura 17** é um exemplo desta reação.

O resultado da testagem das amostras de soroteca estão resumidos na **tabela 14** abaixo:

Tabela 14: Pesquisa de Rickettsia sp. em amostras estocadas de soro do CPV de 255 pacientes com síndrome febril aguda.

Reação	Positivo (%)	Negativo (%)	Total (%)
PCR convencional	0 (0)	255 (100)	255 (100)
PCR em tempo real	02 (0,8)	253 (99,2)	255 (100)

5.6. Identificação de carrapatos coletados

Com base em chaves de identificação, carrapatos capturados para o estudo foram identificados. O espécime trazido junto à amostra de sangue de uma paciente era ninfa de *A. sculptum*. A **figura 19** mostra características taxonômicas utilizadas.

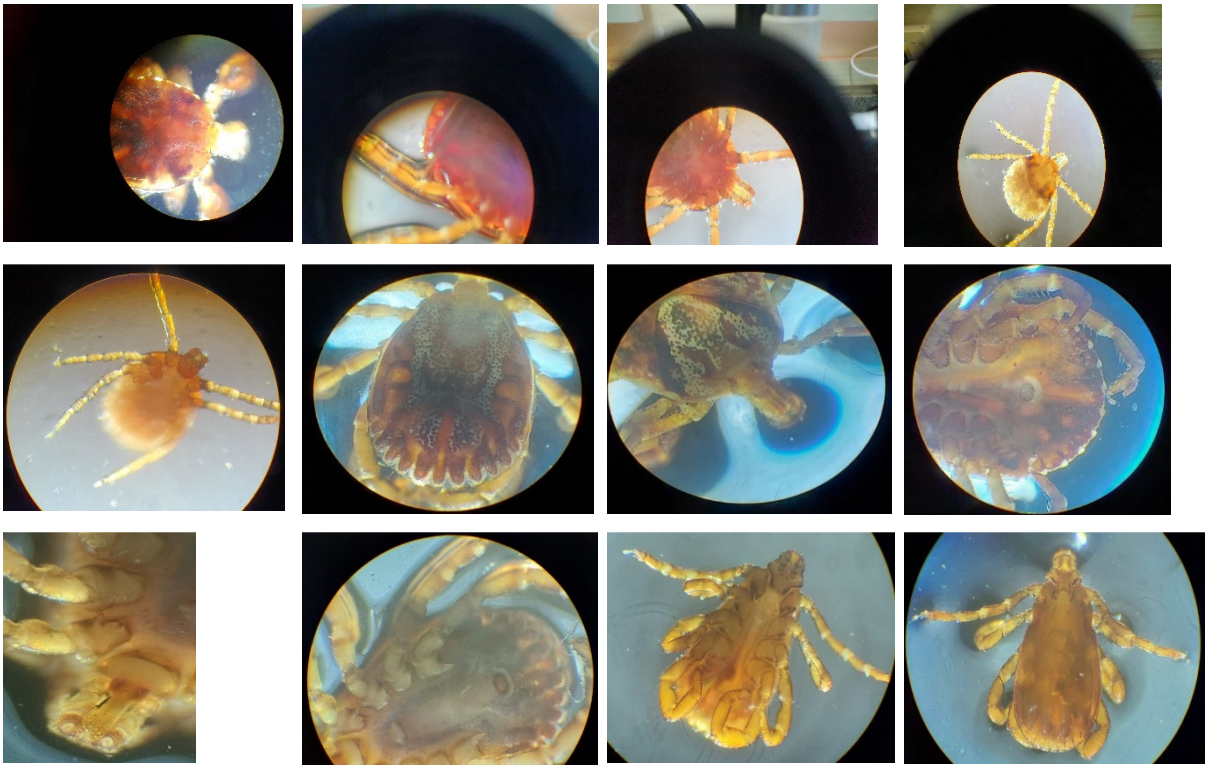

Figura 19: Algumas características de identificação de carrapatos coletados

Legenda: Ninfas de Amblyomma sp.: 1: padrão de pontuações no escudo (profundidade e distribuição) e de sulcos cervicais (extensão e profundidade), formato da base do capítulo; 2: placa espiracular; 3: dentição e espinho externo da 1ª coxa. 4 e 5: faces dorsal e ventral de larva de Amblyomma sp.. 6 e 7: detalhes do esmalte em macho e fêmea adultos de A. sculptum; 8: 4ª coxa, orifício genital e sulco perianal; 9: padrão de dentição e 1ª coxa; 10: espinho 4ª coxa; 11 e 12: faces ventral e dorsal de macho Rhipicephalus sanguineus.

Já a **tabela 15** agrupa as espécies identificadas em função do local de coleta.

Tabela 15: Identificação de 978 carrapatos coletados em Ribeirão Preto/SP

Local / Identificação	A	B	C	D	E	F	G	H	Total
Larvas de *Amblyomma sp.*	0	02	28	03	0	0	05	0	38
Ninfas de *A. dubitatum*	0	0	61	03	0	0	0	0	64
Ninfas de *A. sculptum*	18	11	786	28	03	0	16	0	862
Adulto de *A. sculptum*	0	01 (M)	04 (01 F/ 03 M)	05 (02 F / 03 M)	01 (M)	0	01 (M)	0	12
Adulto de *Rhipicephalus sanguineus*	0	0	01	0		0	0	0	01
Adulto de *Haemaphysalis sp.*	0	01 (M)	0	0		0	0	0	01
Total	18	15	880	39	04	0	22	0	978

M: macho / F: fêmea

5.7. PCR dos carrapatos identificados

PCR convencional CS1 foi negativa nos 69 tubos de carrapatos capturados e no carrapato extraído de paciente (**figura 20**). Por sua vez, no protocolo de PCR em tempo real, 16 amostras de espécimes coletados apresentaram amplificação gênica, com CT médio de 28,4 7,8 ± 2,6 (M_d = 28,0) e de 10,4 ± 0,4 (M_d = 10,4) para o controle positivo (**figura 21**). Destes tubos, 15 são representativos de 288 ninfas de *A. sculptum* (280 do local de coleta C e oito do local D) e o outro tubo de adulto macho de *A. sculptum* capturado no local C.

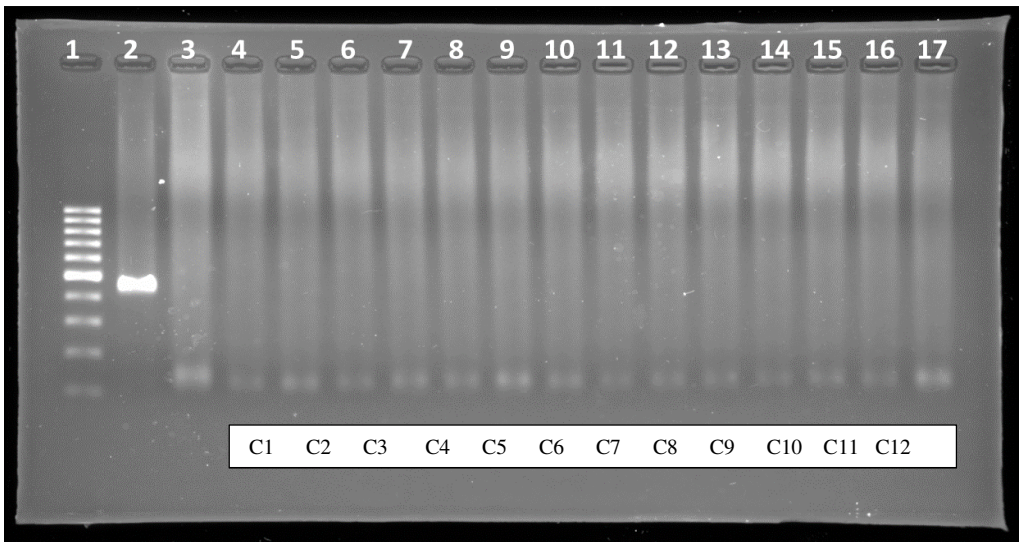

Figura 20: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. Amostras de carrapatos coletados para o estudo

1 *– Marcador de 100 pares de base,* ***2*** *– Controle positivo,* ***3*** *– Controle negativo,* ***4*** *– Carrapato de paciente,* ***5-16*** *– Carrapatos coletados no local C,* ***17*** *– Controle de extração*
Legenda: número de identificação do tubo de carrapato.

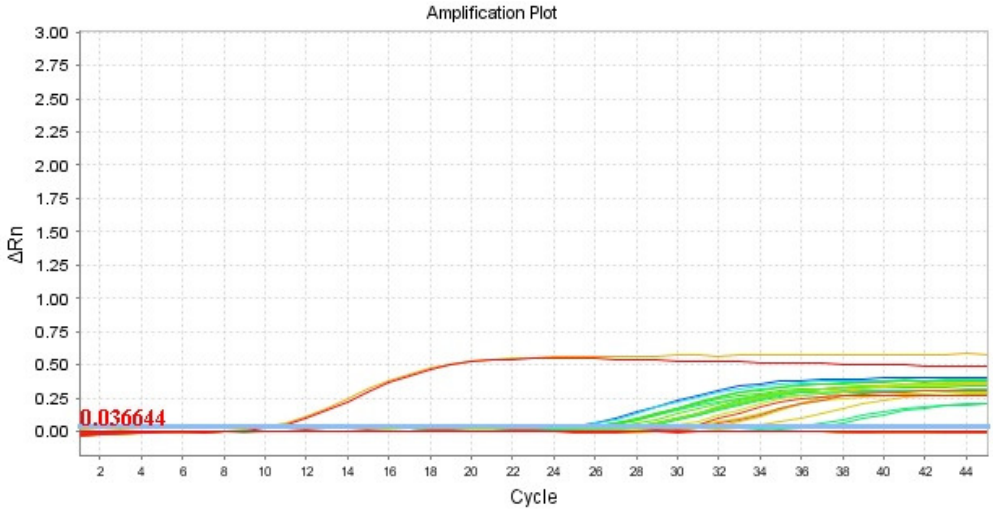

Figura 21: PCR em tempo real para rickettsia em amostras de carrapatos e soro de animais.

5.8. Carrapatos estocados

Os 19 *pools* de carrapatos em estoque foram testados por PCR convencional (CS1) com resultado negativo. Nenhuma dessas amostras teve resultado positivo no protocolo de PCR em tempo real. A **tabela 16** descreve as amostras de carrapatos *Rhipicephalus* sp. segundo localização de coleta. A **figura 22** mostra o gel correspondente a essas amostras.

Tabela 16: Carrapatos do gênero *Rhipicephalus* capturados em Ribeirão Preto, SP.

Rhipicephalus sp.				
Lotes	***N***	**Coleta**	**Endereço**	**Bairro**
1	100	05.05.14	R. Paranaguá, n.848	Vila Albertina
2	16	16.06.14	R. Paulo Roberto Komar, n.1665	Jd Branca Sales
3	15	30.06.14	R. Guarani, n 281	Santa Cruz
4	44	01.07.14	R. Palmiro Tavares de Souza, n. 110	Simioni
5	10	29.07.14	R. Guaporé, n.1524	Ipiranga
6	9	30.07.14	R. Humberto de Campos, n.162	Campos Elíseos
7	12	08.09.14	R. João Franscisco S. Nóbrega, n.83	Pq.Res. Emir Garcia
8	13	08.09.14	R. Ariranha, n.640	Jd. Salgado Filho
9	11	18.09.14	R. Heraldo Fernandes, n.140	Herculano Fernandes
10	06	24.09.14	R. Pedro Ferrarezi, n.865	Paulo G. Romeu

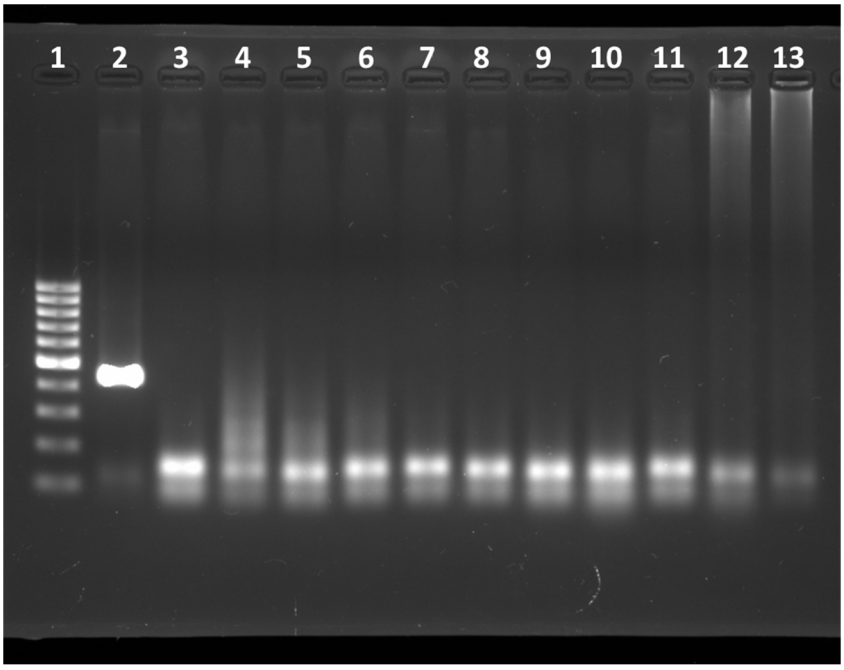

Figura 22: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. Amostras de carrapatos *Rhipicephalus* coletados em Ribeirão Preto.
1 – Marcador de 100 pares de base, **2** – Controle positivo, **3** – Controle negativo, **4-13** – Amostra de pools de carrapatos
Legenda: Ver tabela 20 para descrição de cada amostra.

A **tabela 17** abaixo apresenta as amostras de carrapatos *Amblyomma* sp. segundo localização de coleta, com o gel respectivo na **figura 23**.

Tabela 17: Carrapatos do gênero Amblyomma capturados em Ribeirão Preto, SP.

Amblyomma sp.				
Lotes	**N**	**Coleta**	**Endereço**	**Bairro**
1	5	18.06.14	Av. Manoel Antônio Dias, s/nº	Jd Marchesi
2	173	03.07.14	Parque Maurílio Biagi	Centro
3	7	29.07.14	Av.Café, 2447.1	Vila Amália
4	4	05.08.14	Av. Bandeirantes, n.1360	Vila Virgínia
5	60	14.08.14	R. Cananéia, n.97	Vila Virgínia
6	13*	14.08.14	Av. Bandeirantes, n.384	Vila Virgínia
7	122**	14.08.14	Av. Bandeirantes, n.384	Vila Virgínia
8	34	14.08.14	Av. Bandeirantes, n.1300	Vila Virgínia
9	31	24.09.14	Capivara atropelada na Av. Eduardo A. Matarazzo com R. Pernambuco	Campos Elíseos

Legenda: *Ninfas, ** Larvas

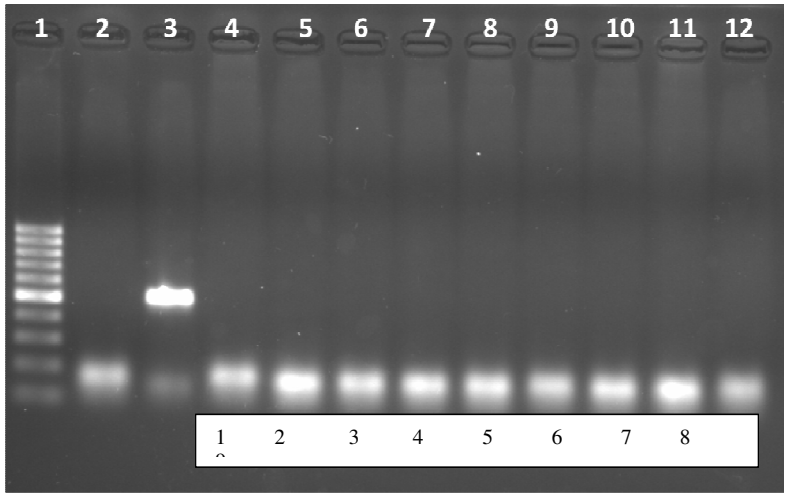

Figura 23: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. PCR convencional para *Rickettsia* sp realizada em carrapatos *Amblyomma* sp. coletados em Ribeirão Preto.
1 – Marcador de 100 pares de base, **2** – Controle negativo, **3** – Controle positivo, **4** -**12** – Amostras de carrapatos
Legenda: Ver tabela 21 para descrição de cada amostra.

A **figura 21** é um exemplo de PCR em tempo real, onde foram analisadas amostras de carrapatos coletados e estocados. Nenhum dos *pools* de carrapatos que estavam armazenados teve amplificação gênica.

5.9. Amostras de animais vertebrados

As amostras armazenadas de 48 animais vertebrados foram avaliadas pelos protocolos de PCR convencional (CS1) e em tempo real, porém sem resultados positivos.

5.10. PCR adicionais

As 20 amostras de pacientes e carrapatos com PCR em tempo real positiva foram avaliadas ainda pelos protocolos de PCR convencionais para CS2, ompB e *hemi-nested* para ompA. Nenhuma amostra apresentou amplificação gênica nas PCR's de CS2 e ompB, como é exemplificado nas **figuras 24 e 25**. Entretanto, uma amostra de carrapatos foi positiva na PCR convencional *hemi-nested* para ompA, como mostrado na **figura 26**.

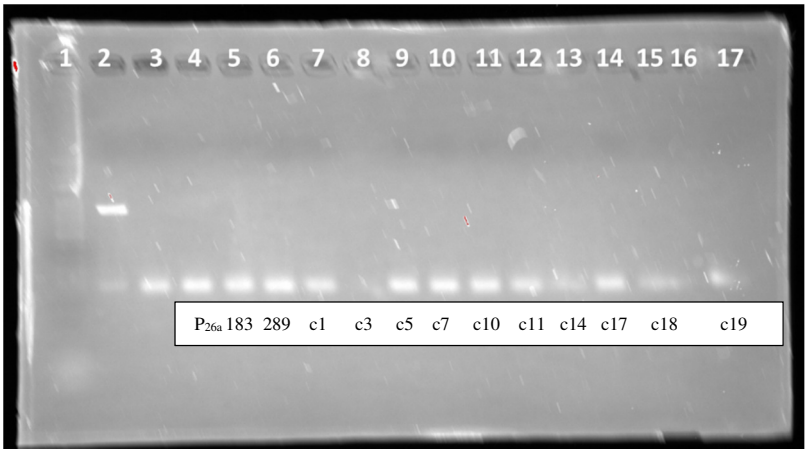

Figura 24: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. Gel em agarose a 1,5% de PCR convencional CS2
1 – Marcador de 100 pares de base, **2** – Controle positivo, **3** – Controle negativo, **4-17** – Amostras
Legenda: P: paciente; c: carrapato; Número: identificação do soro do paciente ou amostra de carrapato.

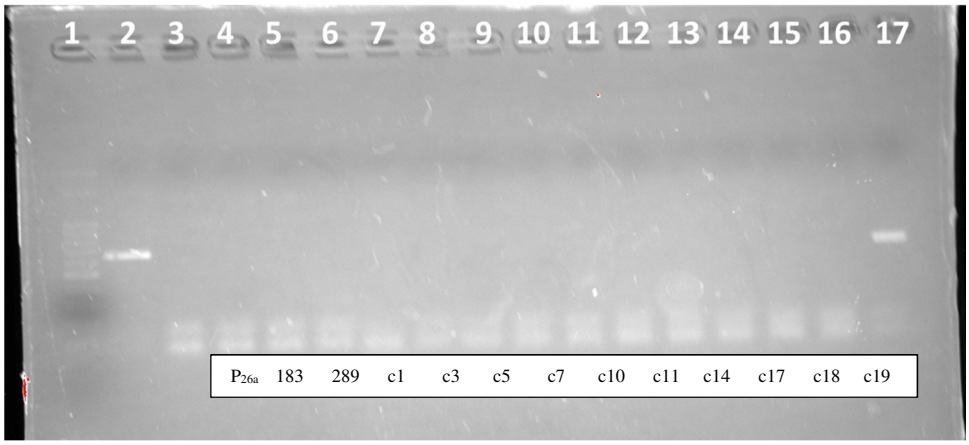

Figura 25: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. Gel em agarose a 1,5% de PCR convencional ompB
1 – Marcador 100 pares de base, **2** – Controle positivo, **3** – Controle negativo, **4-16** – Amostras, **17** – Controle positivo
Legenda: P: paciente; c: carrapato; Número: identificação do soro do paciente ou amostra de carrapato.

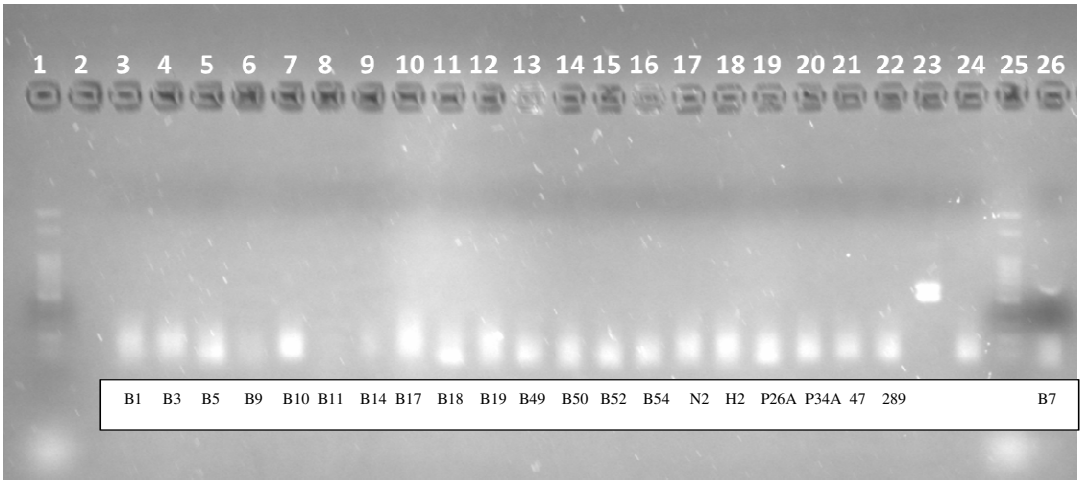

Figura 26: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. *Hemi-nested* para o gene ompA de amostras positivas no tempo real

1 – Marcador de 100 pares de base, **2** – sem conteúdo, **3-22** – Amostras de carrapato, **23** – Controle positivo, **24** – Controle negativo, **25** – Marcador de 100 pares de base, **26** – B7
Legenda: Número: identificação do soro do paciente

5.11. Sequenciamento das amostras positivas

As reações convencionais para os genes gltA (CS1 e CS2) e ompB das 482 amostras foram negativas. No protocolo em tempo real, 20 amostras apresentaram amplificação gênica, sendo duas dos participantes do estudo, duas de soroteca e 16 amostras de carrapatos coletados.

Em 13 das 20 amostras com sinal amplificação de ácidos nucleicos por PCR em tempo real tentou-se proceder sequenciamento genômico: uma amostra de pacientes do estudo (falecida por meningococcemia), duas de soroteca e 10 *pools* de carrapatos, A **figura 27** mostra resultado da eletroforese de produtos obtidos da PCR em tempo real. Bandas específicas obtidas foram excisionadas do gel e purificadas segundo o protocolo. Foi excisionado e purificado ainda o controle positivo na reação convencional CS1.

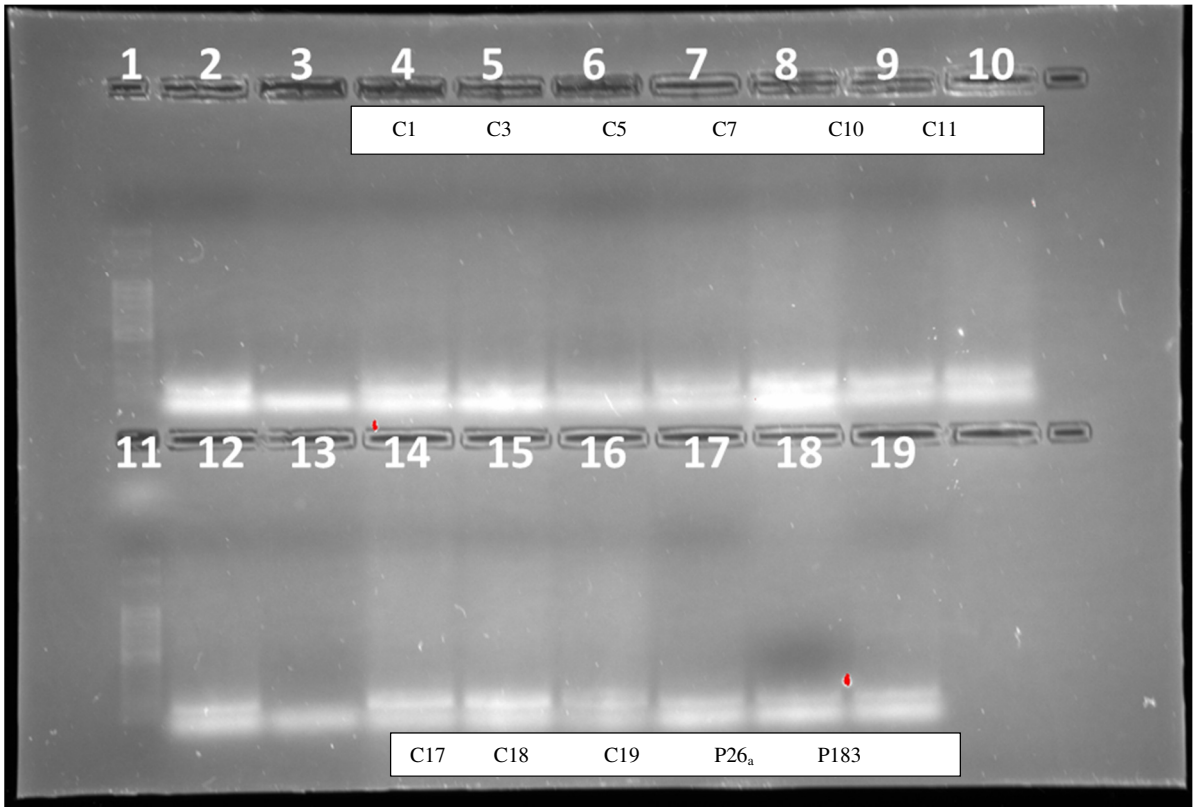

Figura 27: Eletroforese em gel de agarose a 1.5% em TAE, corada por gel red. Produtos positivos de PCR em tempo real de amostra de carrapatos e seres humanos

1 – Marcador 50 pares de base, **2** – Controle positivo, **3** – Controle negativo, **4 -10**– amostras
11 – Marcador 50 pares de base, **12** – Controle positivo, **13** – Controle negativo, **14 -19**– amostras
Legenda: P: paciente; c: carrapato; Número: identificação do soro do paciente ou amostra de carrapato.

Fragmentos muito curtos obtidos das 13 amostras inviabilizaram a identificação etiológica por sequenciamento. Por sua vez, sequenciamento do controle positivo a partir da PCR convencional CS1 revelou similaridade de 98% com *R. amblyommatis* (GenBank: MG674587.1).

6. DISCUSSÃO

As rickettsioses de importância médica são consideradas doenças emergentes ou reemergentes em diversas partes do mundo. Na América Latina por exemplo há várias descrições de FM na primeira metade do século 20, com um vácuo em décadas posteriores. Entretanto, nota-se um evidente aumento de casos nos últimos anos, inclusive com o achado de doença humana associada a outras espécies, além de *R. rickettsii*. Por isso, diversos protocolos e guias buscam ultimamente auxiliar no diagnóstico e manejo clínicos e na detecção rickettsial em vetores (ABARCA; OTEO, 2014; ADEM, 2019; BIGGS; BEHRAVESH; BRADLEY; DAHLGREN *et al.*, 2016; ELDIN; PAROLA, 2018; PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017; ROBINSON; SATJANADUMRONG; HUGHES; STENOS *et al.*, 2019).

Muitos fatores podem estar associados à emergência de rickettsioses: aumento de atividades ao ar livre e viagens a ambientes selvagens, com probabilidade maior de contato humano com carrapatos e consequente aumento no risco de transmissão de doenças; aprimoramento de técnicas de isolamento e de identificação molecular dos patógenos; e maior consciência de médicos e demais profissionais da saúde de casos atípicos. Ainda, espécies rickettsiais de patogenicidade até então desconhecida têm sido descritas nos últimos anos como possíveis futuras candidatas a agentes de rickettsioses. Por fim, alterações climáticas podem influir também na epidemiologia de doenças transmitidas por carrapatos, pois a elevação na temperatura ambiental pode levar a maior distribuição e densidade destes, com aumento de picadas, elevando a incidência de doenças e sua área de risco (EREMEEVA; DASCH, 2015; OTEO; PORTILLO, 2012; PAROLA, 2004).

O desenvolvimento da epidemiologia molecular de doenças infecciosas a partir do final da década de 1970 tem contribuído para a compreensão de sua etiologia, distribuição e prevenção, em níveis individual, familiar e coletivo, nas quais fatores de risco ambientais e genéticos concorrem. No campo da rickettsiologia, a epidemiologia molecular e novas ferramentas diagnósticas têm ajudado o entendimento da dinâmica das doenças, sua transmissão e distribuição e na identificação de novos patógenos. Avanços nos métodos de purificação rickettsial a partir de amostras do hospedeiro, na implementação de novas técnicas de cultivo celular, no desenvolvimento de testes de amplificação, clonagem e sequenciamento de genes rickettsiais ocorreram pelo maior

financiamento em pesquisas, em face ao aumento na incidência de rickettsioses em várias regiões, especialmente do GFM, desde 1970 (EREMEEVA, 2012).

No Brasil, desde 1980, observa-se uma clara reemergência da FMB, após quatro décadas aproximadamente sem notificação de casos. Tal fato deve se relacionar provavelmente a alterações ambientais provocadas pelo ser humano, bem como ao avanço nas técnicas diagnósticas (SPOLIDORIO; LABRUNA; MANTOVANI; BRANDAO *et al.*, 2010; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013). Ademais, apenas em 2001, a FMB foi inserida à lista de doenças de notificação compulsória, incluindo casos suspeitos (GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005; SAÚDE., 2001).

A proposta do presente estudo foi pesquisar a circulação de rickettsias na região de Ribeirão Preto, em amostras clínicas e em carrapatos, por intermédio de protocolos de PCR convencionais e em tempo real de detecção de seu DNA, procurando ativamente evidências de sua presença. Ainda, foram analisadas amostras de alguns animais vertebrados. Das 482 amostras processadas, 345 eram humanas (90 originárias dos 35 pacientes selecionados para o estudo e 255 de banco de soro), 89 amostras de carrapatos, representando 1633 animais (978 coletados para o estudo, 654 de 19 *pools* previamente armazenados e um espécime encontrado parasitando um paciente) e 48 amostras de soro estocados de vertebrados. Carrapatos capturados para a pesquisa eram representativos de espécies comumente parasitárias de capivara, obtidos em pontos de sua circulação na cidade.

Em suma, do total de amostras analisadas, foi possível detectar genoma de rickettsia em 20 (4,1%) por PCR em tempo real. Duas amostras eram de pacientes, duas pertenciam à soroteca e as 16 demais eram amostras de carrapatos coletados para o estudo. Todas as amostras avaliadas por PCR convencional para os genes CS1, CS2 e ompB tiveram resultado negativo. Uma das 16 amostras de carrapatos positivas no tempo real também teve resultado positivo na PCR convencional *hemi-nested* para o gene ompA.

6.1. Amostras humanas analisadas

Foram 35, os pacientes incluídos no estudo, a maioria atendida no HC FMRP USP, com quadro inicial clínico ou epidemiológico compatível com FMB: a maioria apresentava quadro febril agudo e 28 (80,0%) possuíam algum fator epidemiológico para FMB, como ter estado em locais com carrapato ou ter sido picado, visita ou

trabalho rural, contato com animais (exceto cães) e residência ou LPI em áreas endêmicas, como Campinas e Grande São Paulo (cinco pacientes). Dentre esses 28 pacientes, 20 (71,4%) apresentaram sintomatologia inicial com ao menos por febre, cefaleia e/ou *rash*. Em áreas endêmicas, febre e *rash* devem levantar a hipótese de FM. Em dados da literatura, apenas 3% dos casos, se nota a tríade febre, exantema e histórico de picada de carrapato nos três primeiros dias de doença. Em séries latino-americanas, a frequência de *rash* varia de 18 a 100% Excepcionalmente, são observados escara local ou linfadenomegalia regional (ABARCA; OTEO, 2014). Neste estudo, *rash* foi visto em mais de 40% dos casos. Distribuição por sexo e idade e sazonalidade também se assemelharam à descrição de séries brasileiras. A maioria dos pacientes recebeu tratamento específico, reforçando a hipótese clínica inicial de FMB (ANGERAMI; RESENDE; FELTRIN; KATZ *et al*., 2006a; b).

Entretanto, quase 70% dos pacientes participantes do estudo tiveram amostras analisadas pelo IAL com FMB laboratorialmente descartada, a maioria por IFI em amostras pareadas. Porém, sua sensibilidade em soro varia de 84 a 100% em amostras pareadas (DOS SANTOS, 2014). Portanto, somente por sorologia não é possível descartar inteiramente FM ainda que essa hipótese seja remota. Um caso tinha reação de Weil Felix positiva, porém essa reação possui sensibilidade inferior, como já descrito. Pouco mais de 30% não tiveram amostras confirmatórias, muitos por não ter sido obtida a segunda amostra, o que não é um evento incomum. A recuperação plena de sua saúde, após a doença, vivenciada por muitos pacientes acaba por ser um desestímulo à coleta da segunda amostra.

Métodos sorológicos têm limitações: além de não permitirem confirmação diagnóstica na fase sintomática das rickettsioses, eles podem ser negativos nas duas primeiras semanas pós-infecção, não são espécie-específicos e apenas mostram exposição a alguma espécie rickettsial, não necessariamente ao antígeno rickettsial testado. Logo, não são hábeis em discriminar em nível específico. Ainda, a pesquisa em amostra única de soro pode indicar apenas diagnóstico provável, mas não diferencia doença aguda de exposição prévia. Já a detecção de IgM isoladamente não significa necessariamente rickettsiose na fase aguda, uma vez que essa classe de anticorpos pode ser produzida por outras doenças infecciosas. Mesmo na avaliação retrospectiva, sorologia tem limitações, pois há casos de rickettsioses diagnosticados por outros métodos em pacientes sem alteração no título de anticorpos ou com

sorologias persistentemente negativas. (EREMEEVA, 2012; RICHARDS, 2012; STENOS; GRAVES; UNSWORTH, 2005).

Vinte pacientes tiveram diagnósticos finais definidos (não FMB) e 12 diagnósticos inespecíficos (síndrome febril aguda e meningite de predomínio linfomonuclear). Neste último grupo, não foi realizada pesquisa de anticorpos anti-rickettsia pelo IAL em quatro pacientes. Portanto, nesses quatro casos perdurou a hipótese clínica de FMB.

PCR em tempo real foi positiva em apenas duas amostras séricas pertencentes a dois pacientes, dentre 90 amostras produzidas a partir destes 35 casos. Nenhuma amostra de coágulo, plasma rico em leucócitos ou outro material resultou positiva.

Uma das pacientes com PCR positiva em tempo real tinha 11 anos e apresentou febre e *rash* cutâneo, com história de visita prévia em lagoa com presença de capivaras e infestada de carrapatos, tendo recebido tratamento específico para FMB, com melhora clínica. Porém, IFI anti-rickettsial do IAL mostrou-se negativa, assim como sorologias para outras infecções. É importante salientar, todavia, como supracitado, a limitação da sensibilidade da imunofluorescência, cujos antígenos podem não detectar todas as espécies de rickettsia do GFM patogênicas.

A outra paciente em que a PCR foi positiva, faleceu por meningococcemia e não teve amostras analisadas pelo IAL. O resultado desta PCR, ainda que repetidamente confirmado, deve provavelmente representar, um falso-positivo. Porém, *Neisseria meningitidis* é uma β-*Proteobacteria*, filogeneticamente distante do gênero *Rickettsia*. Um experimento mostrou alta especificidade de várias técnicas de PCR num painel com vários agentes infecciosos, inclusive *N. meningitidis* (KATO; CHUNG; ROBINSON; AUSTIN *et al.*, 2013). Por outro lado, num estudo com o mesmo protocolo para gltA usado no presente trabalho, com amostras de casos letais diagnosticados pelo IAL, a reação resultou em alguns resultados duvidosos, com CT's próximos da ciclagem total do protocolo, inclusive com detecção em biópsia de pele em que o agente etiológico era meningococo. Esta mesma amostra teve resultado negativo quando avaliada em outro protocolo de PCR em tempo real para ompA. Esse resultado poderia ser interpretado como inespecificidade de sinal, ainda que esta situação seja aleatória e tenda a não se repetir em replicatas da reação (DOS SANTOS, 2014).

Dos cinco óbitos observados entre os pacientes estudados, apenas dois tiveram exames feitos pelo IAL – que resultaram negativos. Uma limitação do presente

estudo foi a indisponibilidade métodos próprios como padrão-ouro (de cultura ou IFI) que pudessem ter sido empregados na investigação dos casos.

No presente trabalho, a coleta de amostras da maioria dos pacientes foi obtida com mais de cinco dias após a instalação dos sintomas, quando a sensibilidade de PCR começa a declinar, ainda que ao coletar, a maioria não estava em uso de antibióticos específicos.

Ainda, sobre o quadro clínico dos pacientes, quatro casos cursaram com escara no local da picada do carrapato, mas sem adenomegalia local associada. Nenhuma dessas lesões foi biopsiada, o que poderia auxiliar o diagnóstico já que a sensibilidade de PCR para rickettsias é maior nessas amostras. Um esforço de melhor caracterização de casos que apresentem escara no local de inoculação se justifica, já que há descrições no País de FM com manifestações mais leves e baixa letalidade, associadas a outras espécies, como *R. parkeri* cepa Mata Atlântica, e não a *R. rickettsii* (ANGERAMI; CÂMARA; PACOLA; REZENDE *et al.*, 2012; DA PAIXÃO SEVÁ; MARTINS; MUÑOZ-LEAL; RODRIGUES *et al.*, 2019; FACCINI-MARTÍNEZ; MUÑOZ-LEAL; ACOSTA; DE OLIVEIRA *et al.*, 2018; SILVEIRA; PACHECO; SZABÓ; RAMOS *et al.*, 2007).

Se a casuística de FMB em SP reforça o conceito de gravidade, com evolução rápida para instabilidade hemodinâmica, falência múltipla de órgãos e morte, outras séries de casos, como a descrita em Santa Catarina, revelam evolução mais benigna, com destaque à frequência relativamente maior de linfadenomegalias, similar à LAR europeia (ANGERAMI; DA SILVA; NASCIMENTO; COLOMBO *et al.*, 2009).

De fato, manifestações clínicas de diferentes rickettsioses podem ser similares, o que dificulta o seu diagnóstico etiológico. Por outro lado, diversas espécies de rickettsias consideradas não patogênicas, inclusive a maioria do GFM, detectadas em carrapatos, talvez possam resultar em manifestações atípicas, não conhecidas clínica ou laboratorialmente, já que tais espécies não foram isoladas até o momento em seres humanos (GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005; PAROLA, 2004).

Todavia, a maioria dos casos diagnosticados como FMB não tem identificação específica do agente causal, uma vez que métodos tradicionais (imunofluorescência, imuno-histoquímica) possuem reação cruzada entre antígenos de diferentes espécies do GFM. Mesmo nos poucos casos confirmados por PCR em tempo real, geralmente não é feita PCR convencional para posterior sequenciamento genômico da rickettsia infectante (FACCINI-MARTÍNEZ; MUÑOZ-LEAL; ACOSTA; DE OLIVEIRA *et al.*,

2018). É possível que alguns casos considerados como FMB, em particular os de evolução mais benigna, ou de FMMR nos EUA, notadamente quando há escara de inoculação, sejam causados na verdade por *R. parkeri* e não por *R. rickettsii* (ABARCA; OTEO, 2014). Por outro lado, o papel que *R. parkeri* pode desempenhar na etiologia de casos clínicos presumidos de FMB ou outras síndromes febris agudas benignas permanece ainda indeterminado.

A FMB parece se apresentar clinicamente de forma mais grave em comparação à FMMR nos EUA (ANGERAMI; DA SILVA; NASCIMENTO; COLOMBO *et al.*, 2009). Como pontuado previamente, a letalidade da FMB é aproximadamente 10 vezes superior à observada na FMMR, nos EUA e se assemelha à de outros países latinos (ABARCA; OTEO, 2014; BINDER; ARMSTRONG, 2019). Possíveis explicações para maiores gravidade e letalidade no País podem ser: o subdiagnóstico ou diagnóstico tardio, quer pela indisponibilidade de ferramentas laboratoriais rápidas, quer por desconhecimento da doença, que cursa com quadro inicial inespecífico, por serviços de saúde e médicos. Por sua vez, o atraso no diagnóstico, que pode levar à gravidade do quadro, resulta em prescrição tardia da terapia apropriada, que tem opções limitadas. Quando a suspeita é feita precocemente e a terapia iniciada até o terceiro dia da instalação dos sintomas, a letalidade pode ser de 2,0% em crianças e 9,0% em pessoas com mais de 65 anos (DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010; DOS SANTOS; DO NASCIMENTO; KATZ; ANGERAMI *et al.*, 2012).

Fatores associados a vetores, à carga rickettsial inoculada, suscetibilidade do hospedeiro e virulência das cepas também poderiam influir nas diferenças de gravidade e letalidade. Tais diferenças no Brasil talvez favoreçam a aplicação de técnicas moleculares, como PCR em tempo real, como ferramenta diagnóstica em amostras de sangue ou soro. Em países europeus, como a França, o uso de PCR em tempo real tem se expandido na detecção de rickettsioses de evolução benigna, com pouco sucesso em amostras de sangue e soro, mas com excelente desempenho em amostras como biópsia de lesão cutânea e *swab* da escara no local da picada do carrapato (DOS SANTOS, 2014).

Por outro lado, como mencionado anteriormente, o registro de casos de FMMR tem aumentado nas últimas décadas, inversamente à sua letalidade, que vem caindo, desde seu pico na era pré-antibiótica. Tal elevação de incidência está provavelmente associada ao surgimento de novas técnicas diagnósticas e sua maior disponibilização,

à interpretação inadequada de testes sorológicos (muitos casos humanos teve seu diagnóstico baseado em única titulação de anticorpos) e à participação de carrapatos vetores e reservatórios até então desconhecidos. Ainda, à descrição de FM por outras rickettsias além de *R. rickettsii*. A baixa letalidade nacionalmente observada, de 0,3%, comparada à observada no Arizona, de 10%, onde *R. rickettsii* predomina, corrobora essa hipótese. Com efeito, a pesquisa de patógenos em carrapatos demonstrou a presença de outras espécies do GFM: *R. amblyommatis* parasitando *A. americanum* (carrapato estrela solitária), que é comum e agressivo; e *R. montanensis* infectando *D. variabilis*, em proporção maior que *R. rickettsii* (BLANTON, 2019; EREMEEVA, 2012; KATO; CHUNG; ROBINSON; AUSTIN *et al.*, 2013).

Entre os materiais analisados neste estudo, pesquisou-se DNA rickettsial em amostras de soroteca de casos de síndrome febril aguda em que se descartou arboviroses, e que teve duas amostras positivas na PCR em tempo real. Informações clínicas dos pacientes destas amostras não estão disponíveis. Poucos estudos de PCR para rickettsias analisaram amostras em banco de soro (KATO; CHUNG; ROBINSON; AUSTIN *et al.*, 2013). Contudo, esse esforço se justifica, já que a inespecificidade da sintomatologia na fase inicial da FM representa grande desafio diagnóstico a médicos e serviços de saúde. Portanto, suspeição clínica e confirmação laboratorial precoces contribuiriam para melhor prognóstico, pois esse é o período no qual se pode esperar melhor resposta terapêutica aos antimicrobianos. Nessa fase, o quadro de FMB pode ser confundido com outras doenças infecciosas agudas similares e que, muitas vezes, têm evolução benigna, ao contrário do observado na FM. Casos de dengue, resfriado comum, rubéola, sarampo, meningite meningocócica, leptospirose, febre tifoide, sepsis, hepatite viral, borreliose, erliquiose, febre amarela, malária, pneumonia por *Mycoplasma pneumoniae* entre outras, podem ser facilmente confundidos com FMB, o que dificulta e atrasa o diagnóstico de FMB (ABARCA; OTEO, 2014; DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010).

6.2. Amostras de carrapatos e vertebrados

A quase totalidade dos carrapatos coletados neste estudo foi do gênero *Amblyomma*, em áreas onde capivaras são avistadas. A maioria dos exemplares era ninfas de *A. sculptum* e *A. dubitatum*, o que corrobora que tais animais se relacionam a capivaras. O local de maior recuperação de carrapatos em Ribeirão Preto foi o

Jardim Olhos D'água, às margens do lago habitado por capivaras e onde circulam pessoas e cães, com frequentes registros de infestações por carrapatos. Esse bairro é recente, nobre, formado por diversos condomínios residenciais, em área anteriormente agrícola e de mata e o lago compõe área recreacional que funciona como parque.

Dezesseis amostras de carrapatos coletados, todos *A. sculptum*, tiveram amplificação gênica por PCR em tempo real, a maioria oriunda do Jardim Olhos D'água e uma amostra da Via Norte. O local de coleta na Via Norte fica às margens do córrego Ribeirão Preto, no canteiro central de importante avenida, onde pessoas caminham com cães e costumam deixar cavalos que se alimentam no local.

Na PCR convencional *hemi-nested* para ompA, um *pool*, formado por 20 ninfas de *A. sculptum* coletadas no Jardim Olhos D'água, teve resultado positivo.

Outras espécies de rickettsia, algumas de patogenicidade desconhecida, têm sido descritas no País (LUZ; COSTA; BENATTI; RAMOS *et al.*, 2019; SPOLIDORIO; LABRUNA; MANTOVANI; BRANDAO *et al.*, 2010). É necessário, assim, o sequenciamento de *amplicons* obtidos destas amostras positivas para a identificação da espécie em circulação em Ribeirão Preto.

Deve-se ter em mente que o achado de *R. rickettsii* em *A. sculptum* mesmo em áreas endêmicas de FMB é raro. Em estudos experimentais, *A. sculptum* não se mostrou um hospedeiro adequado de *R. rickettsii*, pois é incapaz de perpetuá-la por sucessivas gerações. Poucas regiões são endêmicas para FMB, ainda que haja muitas áreas no Sudeste com grandes populações de capivaras infestadas por *A. sculptum* onde não há casos de FMB. Logo, existem fatores desconhecidos a contribuir para manter ou restringir a endemicidade da FMB no Brasil (SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013).

A população de capivaras tem aumentado no Sudeste, o que pode estar associado à destruição de seu *habitat* natural, à maior oferta de alimento decorrente do crescimento de áreas agrícolas, além da proibição de sua caça por lei federal e ao declínio de seus predadores naturais. Tal fenômeno tem levado à maior invasão de capivaras em áreas urbanas onde há cursos d'água, em parques, condomínios residenciais, empresas, etc. (SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013). Essa invasão é vista também em Ribeirão Preto, cuja região constitui área de risco à ocorrência de surtos e mesmo para endemicidade de rickettsioses do GFM, uma vez que condições sócio-ambientais existem. Localizada entre as bacias dos rios Mogi e Pardo, é cortada

por vasta rede de córregos, os quais perpassam terras agrícolas e áreas urbanas, onde se observa o aumento populacional de capivaras e frequentes infestações de carrapatos. Este trabalho reforça a observação desse fenômeno, o qual vem sendo, inclusive, noticiado na imprensa regional. Além de rickettsias, carrapatos podem estar infectados com outros patógenos, com risco de transmissão para seres humanos, como já demonstrado em Ribeirão Preto (FIGUEIREDO; BADRA; PEREIRA; SZABÓ, 1999).

Nenhuma das amostras de vertebrados analisadas apresentou amplificação gênica. Ainda que o encontro de rickettsias nestes animais fosse pouco provável e inesperado, há evidências da circulação no País de espécies rickettsias, do GFM e de outros grupos, em espécies de gambás e ratos, por exemplo, por PCR em seus ectoparasitas e por pesquisa de anticorpos nos próprios animais (BEZERRA-SANTOS; NOGUEIRA; YAMATOGI; RAMOS *et al.*, 2020; BLANTON, 2019; HORTA; MORAES-FILHO; CASAGRANDE; SAITO *et al.*, 2009; MILAGRES; PADILHA; BARCELOS; GOMES *et al.*, 2010; MILAGRES; PADILHA; MONTANDON; FREITAS *et al.*, 2013; SPOLIDORIO; LABRUNA; MACHADO; MORAES-FILHO *et al.*, 2010; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013).

6.3. Análise das amostras positivas por PCR em tempo real

Pesquisa de DNA rickettsial foi feita nas 482 amostras obtidas para o presente estudo pelos protocolos de PCR em tempo real e convencional para gltA. Do total, 20 amostras positivas foram pela PCR em tempo real: quatro amostras de pacientes (duas dos pacientes incluídos no estudo e duas de amostras de soroteca) e 16 de carrapatos.

A sensibilidade da PCR em tempo real é superior à convencional, como já pontuado, particularmente em amostras de sangue e seu produtos, ainda que em amostras de carrapatos a PCR convencional apresente bons resultados (PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017; RICHARDS, 2012). Ainda assim, num dos primeiros estudos a utilizar PCR convencional utilizando *primers* TZ-15 e TZ-16 se detectou DNA rickettsial em sete de nove (78%) casos confirmados do GFM em coágulo sanguíneo (todos casos fatais). Outro estudo avaliou 50 amostras séricas de casos fatais de GFM, por PCR *nested*, com resultado positivo em 14, chegando a 25 quando se agregou resultados de sorologia e isolamento em cultura (MENDES DO

NASCIMENTO; COLOMBO; NAGASSE-SUGAHARA; ANGERAMI *et al.*, 2009; TZIANABOS; ANDERSON; MCDADE, 1989).

Nos últimos anos, diversos protocolos de PCR em tempo real para rickettsias têm sido desenvolvidos, oferecendo vantagens sobre métodos convencionais e de n*ested*, na rapidez de execução, reprodutibilidade, capacidade de quantificação, menor risco de contaminação e maior sensibilidade por usarem como alvo regiões gênicas menores de 70-150 pb. Ainda, existem métodos que admitem a análise simultânea de grande número de amostras em equipamentos totalmente automatizados. Portanto, são métodos de amplificação mais práticos, rápidos, eficientes e de menor custo. Há protocolos úteis na identificação genérica (panrickettsial) ao usar sítios conservados dos genes ompB, 17-kDa,16S rRNA e gltA. Outros ensaios visam a identificação específica, com genes de 16S rRNA, sca4, ompB, gltA e ompA (EREMEEVA; DASCH; SILVERMAN, 2003; KATO; CHUNG; ROBINSON; AUSTIN *et al.*, 2013; LABRUNA; KRAWCZAK; GERARDI; BINDER *et al.*, 2017; PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017; STENOS; GRAVES; UNSWORTH, 2005).

As sequências gênicas de 16S rRNA e 17 kDa têm baixo poder discriminatório. Já o gene que codifica ompA identifica o GFM, com algumas exceções (*R. helvetica*) e não está presente no GT e no GA (*R. canadenses* e *R. bellii*). O gene de ompB pode ser detectado em todas as espécies rickettsiais, exceto no GA. O gene sca1 está em ao menos 20 espécies, sendo útil na análise filogenética. Por sua vez, o gene gltA é conservado constitutivamente no gênero, não permitindo a identificação específica. PCR em tempo real deste gene possui elevada sensibilidade, de até uma cópia por reação, o que o torna um alvo apropriado para triagem, pois a concentração rickettsial sanguínea é baixa em pessoas rickettsêmicas (PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017; STENOS; GRAVES; UNSWORTH, 2005).

Na tentativa de confirmação das amostras com amplificação gênica por PCR em tempo real para DNA rickettsial, alguns protocolos de PCR convencionais também foram avaliados, além de PCR CS1: um protocolo tendo como alvo um fragmento maior do gltA de 834 pb (CS2) (LABRUNA; PACHECO; NAVA; BRANDÃO *et al.*, 2007) e o outro protocolo para ompB. Nestas reações, em nenhuma das amostras obteve-se amplificação gênica. Por outro lado, na PCR convencional *hemi-nested* para o gene ompA, uma amostra de carrapatos teve resultado positivo para DNA rickettsial, o que comprova a circulação de rickettsias do GFM em Ribeirão Preto.

Um recente estudo confirmou, de forma inédita no Espírito Santo, *R. rickettsii*, utilizando a mesma PCR em tempo real para o gene gtlA usada em nosso trabalho. Naquele estudo, isso ocorreu em amostras séricas de quatro casos fatais de FMB. Esta pesquisa utilizou ainda o mesmo par de *primers* de PCR convencional (CS1) de nosso estudo. Em apenas uma das amostras houve amplificação gênica na PCR convencional para gltA. Ao testar outra PCR convencional para o gene ompA, duas amostras foram positivas (uma delas confirmada por reação adicional *hemi-nested*, a outra não foi analisada). Tal resultado salienta a alta sensibilidade da PCR em tempo real em comparação à convencional. Esta superioridade deve permitir detecção de DNA rickettsial em soro de indivíduos falecidos, como já descrito em SP, pois nestes casos há maior liberação bacteriana no leito sanguíneo, decorrente do dano endotelial, o qual se traduz também em gravidade (FACCINI-MARTÍNEZ; MUÑOZ-LEAL; ACOSTA; DE OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Outro estudo com amostras de casos fatais de FMB diagnosticados pelo IAL comparou dois protocolos distintos de PCR em tempo real de detecção rickettsial do GFM. O primeiro, desenvolvido pelo CDC, baseado na amplificação de um fragmento de 154 pb da região gênica que codifica OmpA, com sensibilidade de até cinco cópias/reação usando como *template* plasmídio clonado, com amplificação sinalizada por agente intercalante de fita dupla de DNA (SYBR *Green*). O segundo protocolo de PCR em tempo real foi o mesmo utilizado no presente estudo, utiliza a região alvo *glt*A (TaqMan), com limite de detecção de uma cópia por reação. Os dois protocolos se mostraram eficientes, ainda que o protocolo para gltA pareceu se mostrar mais sensível e com tendência a resultar em CT's mais baixos. O protocolo baseado em SYBR *Green* também sofreu mais interferência do tipo de matriz biológica (DOS SANTOS, 2014).

Quanto ao tipo de PCR em tempo real, aqueles que utilizam o sistema TaqMan são vantajosos por não requererem a síntese de uma sonda específica cara, o que reduz o custo de cada análise, uma vantagem fundamental quando grande número de amostras são analisadas (EREMEEVA; DASCH; SILVERMAN, 2003).

Por outro lado, há limitações associadas aos métodos moleculares como fatores deletérios capazes de reduzir sua sensibilidade e inclusive produzir resultados falso-negativos: curto período de rickettsemia, que pode ser deprimida por uso de antimicrobianos, condições de coleta e armazenamento de amostras; presença de inibidores da reação, tais como DNAses e RNAses, Fe^{2+} ou heparina; baixa

recuperação de DNA rickettsial no processo de extração; formação de *primer dimers*; interferência de altas concentrações de DNA humano; e variação de afinidade do *primer* no *mix* da reação inicial (GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005; PARIS; BLACKSELL; STENOS; GRAVES *et al.*, 2008; SOUZA; MORAES-FILHO; OGRZEWALSKA; UCHOA *et al.*, 2009).

O valor de CT da PCR de amostras positivas de carrapatos foi, em média, inferior ao observado nas amostras humanas. Além de diferenças esperadas ao se usar distintas matrizes biológicas nas reações moleculares, a baixa rickettsemia observada em pacientes, em função inclusive do uso de antimicrobianos e de sua resposta imune, além da não normalização das leituras das reações, podem ser explicações adicionais para CT mais elevado em amostras humanas.

Por fim, a tentativa de sequenciamento de 13 das 20 amostras positivas por PCR em tempo real incorreu em insucesso, pois os *amplicons* obtidos foram muito curtos, não permitindo caracterização específica ao comparar com sequências disponíveis no *GenBank* (NCBI, EUA). Entretanto, a análise do sequenciamento do *amplicon* do controle positivo usado no protocolo de PCR convencional para o gene gltA (CS1) permitiu sua caracterização como *R. amblyommatis*, com 98% de similaridade.

Usou-se *R. amblyommatis* como controle positivo para as reações, pois não há descrição de sua circulação na região em estudo (PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017).

6.4. Perspectivas para o diagnóstico de rickettsioses no País

No Brasil, atualmente, somente três laboratórios públicos compõem a Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Epidemiológica das Rickettsioses, sendo responsáveis pelo diagnóstico de casos suspeitos de FMB: Fundação Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ – RJ, Laboratório de Referência Nacional, Instituto Adolfo Lutz/IAL – SP e Instituto Ezequiel Dias – MG, Laboratórios de Referência Regionais (DOS SANTOS, 2014).

Em SP, o Laboratório de Rickettsias do IAL atende todo o Estado, além de apoiar Paraná, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul. O IAL realiza métodos indiretos e diretos para diagnóstico da FM. IFI, conforme anteriormente descrito, é o exame padrão no diagnóstico de suspeita de rickettsioses do GFM. Caso

um paciente evolua para óbito antes da coleta da segunda amostra, o que não é incomum pela gravidade da doença, pode ser feita pesquisa de anticorpos específicos para GFM na amostra isolada, considerando provável se título superior a 128. Esse resultado só deve ser valorizado quando associado a aspectos clínicos, epidemiológicos e testes que excluam ou não outras doenças; considerando ainda a ausência de anticorpos detectáveis na janela imunológica, entre o momento da picada do carrapato até sete a 10 dias após o início dos sintomas (DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010; DOS SANTOS, 2014; PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al.*, 2017).

Na prática clínica, deve se ter em conta que semanas a meses podem transcorrer desde a coleta da segunda amostra até que chegue ao médico assistente resultado da IFI, o que não é adequado para o seguimento de pacientes e elucidação diagnóstica.

Os métodos diretos realizados pelo IAL incluem o isolamento bacteriano em cultura celular, a análise histopatológica e imunohistoquímica e métodos moleculares. Isolamento em amostras clínicas é muito útil no diagnóstico de FMB. Contudo, por sua baixa sensibilidade, quando não há crescimento, tem pouco significado propedêutico. Fatores que limitam a sensibilidade incluem uso de antibióticos antes ou concomitante à coleta da amostra e ausência de rickettsemia no momento da obtenção de amostras de sangue. Ainda, condições inadequadas de esterilidade na coleta, armazenamento e transporte das amostras, presentes na maioria dos serviços de saúde (DOS SANTOS, 2014).

Em casos fatais suspeitos de FMB e sem isolamento de rickettsias, a pesquisa de anticorpos em amostra única de sangue possui pouca utilidade clínica. Dados do IAL mostram que dos óbitos por FMB nos quais se isolou rickettsia, em ao menos 60% a IFI foi negativa na amostra única de sangue obtida na fase aguda (DOS SANTOS, 2014). Nesses casos, o IAL tem feito PCR para rickettsia na amostra isolada. Numa análise de mortes por febre íctero-hemorrágica aguda em área endêmica de FMB em SP entre 2009 e 2010, PCR em tempo real se mostrou sensível, inclusive com positividade em pacientes com IFI negativa, o que indicaria precocidade da amostra, quando ainda não há detecção de anticorpos (DOS SANTOS; DO NASCIMENTO; KATZ; ANGERAMI *et al.*, 2012).

Poucos estudos pesquisaram DNA rickettsial em soro de pacientes, pois preferencialmente são usadas amostras teciduais de casos fatais. Até o momento, o

emprego de métodos moleculares para diagnosticar FM no País é restrito a pesquisas e situações particulares, como óbitos com menos de sete dias, sem possibilidade de segunda amostra sérica. Além de limitações de sua aplicação, a utilização rotineira em serviços públicos de saúde exigiria recursos financeiros e protocolos de referência aos laboratórios da rede (DEL SÁ DELFIOL; JUNQUEIRA; DA ROCHA; DE TOLEDO *et al.*, 2010; DOS SANTOS; DO NASCIMENTO; KATZ; ANGERAMI *et al.*, 2012; MENDES DO NASCIMENTO; COLOMBO; NAGASSE-SUGAHARA; ANGERAMI *et al.*, 2009).

As limitações de técnicas convencionais de pesquisa de anticorpos e de cultivo bacteriano no diagnóstico clínico de rickettsioses impõem a necessidade de novas ferramentas baseadas em métodos genômicos ou antigênicos. Para terem valor clínico, tais métodos necessitam ter alta sensibilidade, que permita na fase inicial da sintomatologia auxiliar a instituição da terapia (PARIS; BLACKSELL; STENOS; GRAVES *et al.*, 2008).

Com as técnicas atualmente disponíveis, quanto mais precoce a coleta da amostra biológica maior serão as sensibilidades dos métodos diretos (cultura, testes moleculares), ao passo que quanto mais tardia, maior será possível detecção de anticorpos anti-rickettsia (CHOI; LEE; PARK; KOH *et al.*, 2005). Nestas condições, a combinação de PCR com sorologia seria fundamental para auxiliar na propedêutica diagnóstica das rickettsioses (ABDAD; ABOU ABDALLAH; FOURNIER; STENOS *et al.*, 2018).

6.5. Possíveis contribuições deste estudo para Ribeirão Preto

O conhecimento sobre a ocorrência ou não de rickettsioses na região de Ribeirão Preto faz-se necessário. Para tal, é necessária a disponibilidade de técnicas de diagnóstico e de investigação clínico-epidemiológica.

Dados epidemiológicos (**tabela 2**) indicam que os focos de FMB no Estado de SP mantêm-se ativos, com número preocupante de vítimas fatais. Sua suspeição clínica também aumentou, o que pode ser inferido pela quantidade de pedidos de exames laboratoriais, de 400 em 2004, para quase 2000 em 2012 (DOS SANTOS, 2014). Vê-se ainda, como elemento de preocupação, a ampliação de regiões com casos confirmados (NOGUEIRA ANGERAMI; NUNES; MENDES NASCIMENTO; RIBAS FREITAS *et al.*, 2009). Se tais dados apontam maior vigilância da doença,

especialmente em regiões endêmicas, podem ser indicativos da disseminação da doença para áreas até então livres de casos.

Casos recentes confirmados de FMB na região de Ribeirão Preto (Cajuru, Santa Rosa do Viterbo e Tambaú) mostram que rickettsias têm circulado nesta área do Estado de São Paulo (SINAN, 2020).

O presente trabalho não pôde identificar espécies de *Rickettsia* circulantes na região. Porém, o achado de amostras positivas para DNA rickettsial por PCR em carrapatos em duas áreas residenciais e de lazer no munícipio de Ribeirão Preto e também o encontro do genoma rickettsial em quatro casos humanos fortalece a hipótese de presença dessas bactérias e deve servir de alerta às autoridades públicas para o risco de ocorrerem rickettsioses do GFM.

É necessário o reforço das medidas de controle de carrapatos com o manejo adequado para a redução de populações de capivaras. Muitos parques e áreas, inclusive a região no Jardim Olhos D'água, tiveram recentemente proibição da circulação de pessoas em decorrência de infestações por carrapatos.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam a necessidade de prosseguir com o monitoramento de carrapatos em áreas urbanas e peri-urbanas em Ribeirão Preto, notadamente no Jardim Olhos D'água e na Via Norte, com a identificação de suas espécies e pesquisa de rickettsias por PCR por amostragem nas mesmas.

Outra possibilidade de pesquisa colocada a partir do presente estudo é a realização de um estudo sorológico populacional, em particular de habitantes que residam em áreas adjacentes onde circulam capivaras e há infestações de carrapatos. Inquéritos sorepidemiológicos populacionais são úteis no conhecimento da prevalência de anticorpos anti-rickettsia, permitindo avaliar a ocorrência de espécies em determinadas regiões e seu potencial risco de circulação. Servem ainda na obtenção de *cut-offs* para os testes diagnósticos (DE LEMOS; ALVARENGA; CINTRA; RAMOS *et al*., 2001; PORTILLO; DE SOUSA; SANTIBÁÑEZ; DUARTE *et al*., 2017; RICHARDS, 2012).

Nova tentativa de sequenciamento das 20 amostras positivas deverá ser feita, subsequentemente, podendo usar, por exemplo, metodologia baseada em clonagem por plasmídio, o que permitiria melhorar o sequenciamento destas amostras, facilitando a identificação das espécies encontradas.

Pesquisas também devem ser aprofundadas não apenas para determinar a eventual circulação *R. rickettsii*, mas também de outras espécies do GFM e do GT e

seu vetores, bem como de espécies rickettsiais cuja patogenicidade ainda não esteja estabelecida.

Deve ser enfatizado, ainda, que a avaliação clínica persiste como a ferramenta diagnóstica rápida e valiosa disponível até o momento (GALVÃO; SILVA; NASCIMENTO; CALIC *et al.*, 2005). Portanto, profissionais de saúde devem ser melhor treinados para reconhecer e tratar casos suspeitos de FM.

O diagnóstico rápido de rickettsiose é fundamental à prescrição de terapêutica adequada, o que pode ter impacto no prognóstico. Ainda que tratamento empírico siga sendo preconizado em casos suspeitos de rickettsioses, o aprimoramento de técnicas diagnósticas moleculares aplicáveis em espécimes clínicos na fase aguda poderá auxiliar na redução de fatalidades, o que tem implicação na elaboração de ações de saúde pública e manejo dessas doenças. (KATO; CHUNG; ROBINSON; AUSTIN *et al.*, 2013).

A incorporação da PCR em tempo real, avaliada neste estudo, aos exames de rotina laboratorial do HC FMRP USP, para pesquisa de DNA rickettsial em amostras clínicas, pode ser útil na propedêutica diagnóstica de casos suspeitos de FMB. Seu uso é indicado nos primeiros dias de doença e em casos graves, quando decisões podem influir na evolução clínica, enquanto se aguarda o resultado da pesquisa de anticorpos. Essa técnica também pode ser usada na elucidação de eventuais casos fatais, o que é fundamental como medida de vigilância epidemiológica em saúde pública.

A PCR em tempo real para rickettsias pode ser uma ferramenta útil para diagnóstico clínico de casos suspeitos de FMB, em associação com as técnicas clássicas de pesquisa de anticorpos.

7. Conclusões

Este estudo pesquisou DNA de rickettsias em amostras clínicas e em carrapatos na região de Ribeirão Preto, obtendo resultado positivo por PCR em tempo real panrickettsial em 4,1% das amostras analisadas.

Duas das amostras positivas foram de pacientes participantes do estudo, outras duas da soroteca de pacientes com síndrome febril aguda e 16 foram amostras de carrapatos coletados no munícipio de Ribeirão Preto, em locais com a presença de capivaras.

Uma das amostras de carrapato foi confirmada como de rickettsia do GFM. Rickettsias potencialmente causadoras de Febre Maculosa ocorrem na Região de Ribeirão Preto/SP podendo causar infecção esporádica em seres humanos.

8. REFERÊNCIAS

ABARCA, K.; OTEO, J. A. [Clinical approach and main tick-borne rickettsiosis present in Latin America]. **Rev Chilena Infectol**, 31, n. 5, p. 569-576, Oct 2014.

ABDAD, M. Y.; ABOU ABDALLAH, R.; FOURNIER, P. E.; STENOS, J. *et al.* A Concise Review of the Epidemiology and Diagnostics of Rickettsioses: Rickettsia and Orientia spp. **J Clin Microbiol**, 56, n. 8, 08 2018.

ADEM, P. V. Emerging and re-emerging rickettsial infections. **Semin Diagn Pathol**, 36, n. 3, p. 146-151, May 2019.

ANGELAKIS, E.; RICHET, H.; ROLAIN, J. M.; LA SCOLA, B. *et al.* Comparison of real-time quantitative PCR and culture for the diagnosis of emerging Rickettsioses. **PLoS Negl Trop Dis**, 6, n. 3, p. e1540, 2012.

ANGERAMI, R. N.; CÂMARA, M.; PACOLA, M. R.; REZENDE, R. C. *et al.* Features of Brazilian spotted fever in two different endemic areas in Brazil. **Ticks Tick Borne Dis**, 3, n. 5-6, p. 346-348, Dec 2012.

ANGERAMI, R. N.; DA SILVA, A. M.; NASCIMENTO, E. M.; COLOMBO, S. *et al.* Brazilian spotted fever: two faces of a same disease? A comparative study of clinical aspects between an old and a new endemic area in Brazil. **Clin Microbiol Infect**, 15 Suppl 2, p. 207-208, Dec 2009.

ANGERAMI, R. N.; RESENDE, M. R.; FELTRIN, A. F.; KATZ, G. *et al.* Brazilian spotted fever: a case series from an endemic area in southeastern Brazil: clinical aspects. **Ann N Y Acad Sci**, 1078, p. 252-254, Oct 2006a.

ANGERAMI, R. N.; RESENDE, M. R.; FELTRIN, A. F.; KATZ, G. *et al.* Brazilian spotted fever: a case series from an endemic area in southeastern Brazil: epidemiological aspects. **Ann N Y Acad Sci**, 1078, p. 170-172, Oct 2006b.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies.** Instituto Butantan, Brasil., 2006.

BEZERRA-SANTOS, M. A.; NOGUEIRA, B. C. F.; YAMATOGI, R. S.; RAMOS, R. A. N. *et al.* Ticks, fleas and endosymbionts in the ectoparasite fauna of the black-eared opossum Dipelphis aurita in Brazil. **Exp Appl Acarol**, Jan 2020.

BIGGS, H. M.; BEHRAVESH, C. B.; BRADLEY, K. K.; DAHLGREN, F. S. *et al.* Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases: Rocky Mountain Spotted Fever and Other Spotted Fever Group Rickettsioses, Ehrlichioses, and Anaplasmosis - United States. **MMWR Recomm Rep**, 65, n. 2, p. 1-44, May 2016.

BINDER, A. M.; ARMSTRONG, P. A. Increase in Reports of Tick-Borne Rickettsial Diseases in the United States. **Am J Nurs**, 119, n. 7, p. 20-21, 07 2019.

BLACK, W. C.; PIESMAN, J. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 91, n. 21, p. 10034-10038, Oct 1994.

BLANTON, L. S. The Rickettsioses: A Practical Update. **Infect Dis Clin North Am**, 33, n. 1, p. 213-229, 03 2019.

CHAPMAN, A. S.; BAKKEN, J. S.; FOLK, S. M.; PADDOCK, C. D. *et al.* 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. **MMWR Recomm Rep**, 55, n. RR-4, p. 1-27, Mar 2006.

CHOI, Y. J.; LEE, S. H.; PARK, K. H.; KOH, Y. S. *et al.* Evaluation of PCR-based assay for diagnosis of spotted fever group rickettsiosis in human serum samples. **Clin Diagn Lab Immunol**, 12, n. 6, p. 759-763, Jun 2005.

CUNHA, B. A. Clinical features of Rocky Mountain spotted fever. **Lancet Infect Dis**, 8, n. 3, p. 143-144, Mar 2008.

DA PAIXÃO SEVÁ, A.; MARTINS, T. F.; MUÑOZ-LEAL, S.; RODRIGUES, A. C. *et al.* A human case of spotted fever caused by Rickettsia parkeri strain Atlantic rainforest and its association to the tick Amblyomma ovale. **Parasit Vectors**, 12, n. 1, p. 471, Oct 2019.

DE LEMOS, E. R.; ALVARENGA, F. B.; CINTRA, M. L.; RAMOS, M. C. *et al.* Spotted fever in Brazil: a seroepidemiological study and description of clinical cases in an endemic area in the state of São Paulo. **Am J Trop Med Hyg**, 65, n. 4, p. 329-334, Oct 2001.

DE LIMA, V. L.; DE SOUZA, S. S.; DE SOUZA, C. E.; VILELA, M. F. *et al.* [Spotted fever in Campinas region, State of São Paulo, Brazil]. **Cad Saude Publica**, 19, n. 1, p. 331-334, 2003 Jan-Feb 2003.

DEL SÁ DELFIOL, F.; JUNQUEIRA, F. M.; DA ROCHA, M. C.; DE TOLEDO, M. I. *et al.* [Rocky Mountain spotted fever in Brazil]. **Rev Panam Salud Publica**, 27, n. 6, p. 461-466, Jun 2010.

DOS SANTOS, F. C.; DO NASCIMENTO, E. M.; KATZ, G.; ANGERAMI, R. N. *et al.* Brazilian spotted fever: real-time PCR for diagnosis of fatal cases. **Ticks Tick Borne Dis**, 3, n. 5-6, p. 312-314, Dec 2012.

DOS SANTOS, F. C. P. **Aplicações da PCR em tempo real no diagnóstico laboratorial da Febre Maculosa Brasileira**. 2014. (doutorado) - Programa de Pós Graduação em Ciências, Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

ELDIN, C.; PAROLA, P. Update on Tick-Borne Bacterial Diseases in Travelers. **Curr Infect Dis Rep**, 20, n. 7, p. 17, May 2018.

EREMEEVA, M. E. Molecular epidemiology of rickettsial diseases in North America. **Ticks Tick Borne Dis**, 3, n. 5-6, p. 332-337, Dec 2012.

EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A. Challenges posed by tick-borne rickettsiae: eco-epidemiology and public health implications. **Front Public Health**, 3, p. 55, 2015.

EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A.; SILVERMAN, D. J. Evaluation of a PCR assay for quantitation of Rickettsia rickettsii and closely related spotted fever group rickettsiae. **J Clin Microbiol**, 41, n. 12, p. 5466-5472, Dec 2003.

FACCINI-MARTÍNEZ, Á.; MUÑOZ-LEAL, S.; ACOSTA, I. C. L.; DE OLIVEIRA, S. V. *et al.* Confirming Rickettsia rickettsii as the etiological agent of lethal spotted fever group rickettsiosis in human patients from Espírito Santo state, Brazil. **Ticks Tick Borne Dis**, 9, n. 3, p. 496-499, 03 2018.

FIGUEIREDO, L. T.; BADRA, S. J.; PEREIRA, L. E.; SZABÓ, M. P. Report on ticks collected in the Southeast and Mid-West regions of Brazil: analyzing the potential transmission of tick-borne pathogens to man. **Rev Soc Bras Med Trop**, 32, n. 6, p. 613-619, 1999 Nov-Dec 1999.

GALVÃO, M. A.; LAMOUNIER, J. A.; BONOMO, E.; TROPIA, M. S. *et al.* [Emerging and reemerging rickettsiosis in an endemic area of Minas Gerais State, Brazil]. **Cad Saude Publica**, 18, n. 6, p. 1593-1597, 2002 Nov-Dec 2002.

GALVÃO, M. A.; SILVA, L. J.; NASCIMENTO, E. M.; CALIC, S. B. *et al.* [Rickettsial diseases in Brazil and Portugal: occurrence, distribution and diagnosis]. **Rev Saude Publica**, 39, n. 5, p. 850-856, Oct 2005.

HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; CASAGRANDE, R. A.; SAITO, T. B. *et al.* Experimental infection of opossums Didelphis aurita by Rickettsia rickettsii and evaluation of the transmission of the infection to ticks Amblyomma cajennense. **Vector Borne Zoonotic Dis**, 9, n. 1, p. 109-118, Feb 2009.

KATO, C. Y.; CHUNG, I. H.; ROBINSON, L. K.; AUSTIN, A. L. *et al.* Assessment of real-time PCR assay for detection of Rickettsia spp. and Rickettsia rickettsii in banked clinical samples. **J Clin Microbiol**, 51, n. 1, p. 314-317, Jan 2013.

LABRUNA, M. B.; KRAWCZAK, F. S.; GERARDI, M.; BINDER, L. C. *et al.* Isolation of Rickettsia rickettsii from the tick Amblyomma sculptum from a Brazilian spotted fever-endemic area in the Pampulha Lake region, southeastern Brazil. **Vet Parasitol Reg Stud Reports**, 8, p. 82-85, May 2017.

LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; NAVA, S.; BRANDÃO, P. E. *et al.* Infection by Rickettsia bellii and Candidatus "Rickettsia amblyommii" in Amblyomma neumanni ticks from Argentina. **Microb Ecol**, 54, n. 1, p. 126-133, Jul 2007.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C.; BOUYER, D. H. *et al.* Rickettsia species infecting Amblyomma cooperi ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **J Clin Microbiol**, 42, n. 1, p. 90-98, Jan 2004.

LUZ, H. R.; COSTA, F. B.; BENATTI, H. R.; RAMOS, V. N. *et al.* Epidemiology of capybara-associated Brazilian spotted fever. **PLoS Negl Trop Dis**, 13, n. 9, p. e0007734, 09 2019.

MANSUETO, P.; VITALE, G.; CASCIO, A.; SEIDITA, A. *et al.* New insight into immunity and immunopathology of Rickettsial diseases. **Clin Dev Immunol**, 2012, p. 967852, 2012.

MARTINS, T. F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Nymphs of the genus Amblyomma (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescriptions, and identification key. **Ticks Tick Borne Dis**, 1, n. 2, p. 75-99, Jun 2010.

MENDES DO NASCIMENTO, E. M.; COLOMBO, S.; NAGASSE-SUGAHARA, T. K.; ANGERAMI, R. N. *et al.* Evaluation of PCR-based assay in human serum samples for diagnosis of fatal cases of spotted fever group rickettsiosis. **Clin Microbiol Infect**, 15 Suppl 2, p. 232-234, Dec 2009.

MILAGRES, B. S.; PADILHA, A. F.; BARCELOS, R. M.; GOMES, G. G. *et al.* Rickettsia in synanthropic and domestic animals and their hosts from two areas of low endemicity for Brazilian spotted fever in the eastern region of Minas Gerais, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, 83, n. 6, p. 1305-1307, Dec 2010.

MILAGRES, B. S.; PADILHA, A. F.; MONTANDON, C. E.; FREITAS, R. N. *et al.* Spotted fever group Rickettsia in small rodents from areas of low endemicity for Brazilian spotted fever in the eastern region of Minas Gerais State, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, 88, n. 5, p. 937-939, May 2013.

MINERVINO, A. H. H.; LABRUNA, M. B.; DIAS, S. R.; COSTA, F. B. *et al.* Typhus Group Rickettsiosis, Brazilian Amazon. **Emerg Infect Dis**, 26, n. 9, p. 2294-2296, 09 2020.

NOGUEIRA ANGERAMI, R.; NUNES, E. M.; MENDES NASCIMENTO, E. M.; RIBAS FREITAS, A. *et al.* Clusters of Brazilian spotted fever in São Paulo State, southeastern Brazil. A review of official reports and the scientific literature. **Clin Microbiol Infect**, 15 Suppl 2, p. 202-204, Dec 2009.

OTEO, J. A.; NAVA, S.; SOUSA, R.; MATTAR, S. *et al.* [Latinamerican guidelines of RIICER for diagnosis of tick-borne rickettsioses]. **Rev Chilena Infectol**, 31, n. 1, p. 54-65, Feb 2014.

OTEO, J. A.; PORTILLO, A. Tick-borne rickettsioses in Europe. **Ticks Tick Borne Dis**, 3, n. 5-6, p. 271-278, Dec 2012.

PARIS, D. H.; BLACKSELL, S. D.; STENOS, J.; GRAVES, S. R. *et al.* Real-time multiplex PCR assay for detection and differentiation of rickettsiae and orientiae. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 102, n. 2, p. 186-193, Feb 2008.

PAROLA, P. Tick-borne rickettsial diseases: emerging risks in Europe. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, 27, n. 5, p. 297-304, Sep 2004.

PORTILLO, A.; DE SOUSA, R.; SANTIBÁÑEZ, S.; DUARTE, A. *et al.* Guidelines for the Detection of Rickettsia spp. **Vector Borne Zoonotic Dis**, 17, n. 1, p. 23-32, 01 2017.

REGNERY, R. L.; SPRUILL, C. L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **J Bacteriol**, 173, n. 5, p. 1576-1589, Mar 1991.

RENVOISÉ, A.; ROLAIN, J. M.; SOCOLOVSCHI, C.; RAOULT, D. Widespread use of real-time PCR for rickettsial diagnosis. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 64, n. 1, p. 126-129, Feb 2012.

RICHARDS, A. L. Worldwide detection and identification of new and old rickettsiae and rickettsial diseases. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 64, n. 1, p. 107-110, Feb 2012.

ROBINSON, M. T.; SATJANADUMRONG, J.; HUGHES, T.; STENOS, J. *et al.* Diagnosis of spotted fever group. **Epidemiol Infect**, 147, p. e286, Oct 2019.

SAÚDE., M. D. Portaria n 1943, de 18 de outubro de 2001.
Define a relação de doenças de notificação compulsória para todo território nacional. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília. v.10, n.1,**:** p.35 p. 2001.

SILVA, L. J.; PAPAIORDANOU, P. M. Murine (endemic) typhus in Brazil: case report and review. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 46, n. 5, p. 283-285, 2004 Sep-Oct 2004.

SILVA, N.; EREMEEVA, M. E.; ROZENTAL, T.; RIBEIRO, G. S. *et al.* Eschar-associated spotted fever rickettsiosis, Bahia, Brazil. **Emerg Infect Dis**, 17, n. 2, p. 275-278, Feb 2011.

SILVEIRA, I.; PACHECO, R. C.; SZABÓ, M. P.; RAMOS, H. G. *et al.* Rickettsia parkeri in Brazil. **Emerg Infect Dis**, 13, n. 7, p. 1111-1113, Jul 2007.

SINAN. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação** MINISTÉRIO DA SÁUDE DO BRASIL, 2020. Disponível em: http://portalweb04.saude.gov.br/sinan_net/default.asp. Acesso em: 06 de fevereiro de 2020.

SOUZA, C. E.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWALSKA, M.; UCHOA, F. C. *et al.* Experimental infection of capybaras Hydrochoerus hydrochaeris by Rickettsia rickettsii and evaluation of the transmission of the infection to ticks Amblyomma cajennense. **Vet Parasitol**, 161, n. 1-2, p. 116-121, Apr 2009.

SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B.; MACHADO, R. Z.; MORAES-FILHO, J. *et al.* Survey for tick-borne zoonoses in the state of Espirito Santo, southeastern Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, 83, n. 1, p. 201-206, Jul 2010.

SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B.; MANTOVANI, E.; BRANDAO, P. E. *et al.* Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. **Emerg Infect Dis**, 16, n. 3, p. 521-523, Mar 2010.

STENOS, J.; GRAVES, S. R.; UNSWORTH, N. B. A highly sensitive and specific real-time PCR assay for the detection of spotted fever and typhus group Rickettsiae. **Am J Trop Med Hyg**, 73, n. 6, p. 1083-1085, Dec 2005.

SZABÓ, M. P.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Front Cell Infect Microbiol**, 3, p. 27, 2013.

TZIANABOS, T.; ANDERSON, B. E.; MCDADE, J. E. Detection of Rickettsia rickettsii DNA in clinical specimens by using polymerase chain reaction technology. **J Clin Microbiol**, 27, n. 12, p. 2866-2868, Dec 1989.

VIEIRA, A. M. L.; SOUZA, C. E.; LABRUNA, M. B.; MAYO, R. C. *et al.* **Manual de Vigilância Acarológica.** Superintendência de Controles de Endemias (SUCEN). 2002.

WALKER, D. H.; ISMAIL, N. Emerging and re-emerging rickettsioses: endothelial cell infection and early disease events. **Nat Rev Microbiol**, 6, n. 5, p. 375-386, May 2008.

9. ANEXOS

Anexo I

Número de casos confirmados por FMB entre 2000 e 2019, por unidade da federação (Dados parciais até agosto de 2019. Fonte: SINAN).

Casos confirmados de febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2019*

Região e UF	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019*
Região Norte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	3	1	1
Rondônia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
Acre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Amazonas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Roraima	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Pará	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Amapá	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tocantins	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0
Região Nordeste	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	0	2	3	2	4	0	2	2	1
Maranhão	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piauí	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ceará	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3	2	3	0	1	2	0
Rio Grande do Norte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Paraíba	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Pernambuco	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Alagoas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sergipe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bahia	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Região Sudeste	41	25	20	54	76	90	62	57	58	78	77	104	90	77	107	124	99	119	183	14
Minas Gerais	23	9	10	9	24	11	18	13	11	9	10	13	7	14	11	16	20	33	72	2
Espírito Santo	2	0	0	13	11	0	0	3	1	0	4	7	5	4	3	5	6	6	0	0
Rio de Janeiro	0	1	1	2	0	24	7	10	7	8	5	13	4	4	22	14	12	16	7	1
São Paulo	16	15	9	30	41	55	37	31	39	61	58	71	74	55	71	89	61	64	104	11
Região Sul	0	0	0	6	8	39	22	33	27	41	27	28	41	35	56	26	23	39	49	20
Paraná	0	0	0	0	0	0	1	2	2	1	3	2	4	2	4	6	1	9	3	7
Santa Catarina	0	0	0	6	8	36	21	29	25	38	24	25	37	31	51	20	22	28	43	13
Rio Grande do Sul	0	0	0	0	0	3	0	2	0	2	0	1	0	2	1	0	0	2	3	0
Região Centro-Oeste	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	2	1	2	6	4	2	2	1
Mato Grosso do Sul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	0	1	0
Mato Grosso	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	1
Goiás	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	4	1	2	1	0
Distrito Federal	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Brasil	41	25	20	60	84	130	85	91	85	121	106	132	135	116	167	162	128	165	237	37

Fonte: Sinan - atualizado em 13/06/2019

*Dados sujeitos à revisão

Anexo II

Número de óbitos por FMB entre 2000 e 2019, por unidade da federação

(Dados parciais até agosto de 2019. Fonte: SINAN).

Óbitos de febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000-2019*

Região e UF	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019*
Região Norte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rondônia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amazonas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Roraima	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pará	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amapá	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tocantins	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Região Nordeste	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Maranhão	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piauí	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ceará	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rio Grande do Norte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Paraíba	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pernambuco	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Alagoas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sergipe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bahia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Região Sudeste	15	13	6	18	20	26	25	16	21	30	26	45	52	37	65	63	50	58	87	2
Minas Gerais	11	1	1	1	9	6	8	6	5	4	1	5	4	5	4	4	6	17	23	1
Espírito Santo	2	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	1	5	1	0	3	2	4	0	0
Rio de Janeiro	0	1	1	1	0	4	5	2	2	3	1	4	2	1	7	2	7	6	6	0
São Paulo	2	11	4	12	11	16	12	8	14	23	24	35	41	30	54	54	35	31	58	1
Região Sul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	0	1	1	0
Paraná	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	0	1	1	0
Santa Catarina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rio Grande do Sul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Região Centro-Oeste	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Mato Grosso do Sul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mato Grosso	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Goiás	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Distrito Federal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Brasil	15	13	6	18	20	26	25	16	21	31	27	45	52	37	66	66	50	59	88	2

Fonte: Sinan - atualizado em 13/06/2019

*Dados sujeitos à revisão

Anexo III

Número de casos confirmados de FMB entre 2007 e 2020, segundo Grupo de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo

(Dados parciais até fevereiro de 2020. Fonte: SINAN).

Casos confirmados autóctones de febre maculosa brasileira (FMB) de 2007 a 2020* por GVE de residência e ano de início dos sintomas (IS)

GVE Residência	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	Total
1331 GVE 1 CAPITAL	0	5	4	6	7	6	3	2	2	1	3	5	4	48
1332 GVE 7 SANTO ANDRE	6	8	7	7	5	10	4	6	6	6	4	4	1	74
1333 GVE 8 MOGI DAS CRUZES	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	4
1334 GVE 9 FRANCO DA ROCHA	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
1335 GVE 10 OSASCO	0	1	0	2	0	2	1	2	2	0	0	0	0	10
1336 GVE 11 ARACATUBA	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1337 GVE 12 ARARAQUARA	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2
1338 GVE 13 ASSIS	5	5	1	1	2	6	5	5	9	5	4	6	11	65
1339 GVE 14 BARRETOS	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2
1340 GVE 15 BAURU	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2
1341 GVE 16 BOTUCATU	0	1	0	2	1	2	1	0	2	2	0	0	3	14
1342 GVE 17 CAMPINAS	17	18	37	44	38	29	20	38	39	41	28	54	33	436
1343 GVE 18 FRANCA	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1344 GVE 19 MARILIA	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	7
1345 GVE 20 PIRACICABA	4	3	10	3	11	11	16	17	23	8	18	16	18	158
1346 GVE 21 PRESIDENTE PRUDENTE	0	0	0	0	1	2	2	1	2	0	0	0	0	8
1573 GVE 22 PRESIDENTE VENCESLAU	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2
1347 GVE 23 REGISTRO	1	1	1	0	2	1	0	1	0	0	0	1	2	10
1348 GVE 24 RIBEIRAO PRETO	0	0	0	0	2	0	0	0	3	0	1	1	0	7
1349 GVE 25 SANTOS	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
1350 GVE 26 SAO JOAO DA BOA VISTA	2	1	1	1	0	1	2	0	2	1	2	3	0	16
1351 GVE 27 SAO JOSE DOS CAMPOS	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1	1	7	0	13
1576 GVE 28 CARAGUATATUBA	0	1	3	0	5	0	0	0	3	1	1	3	0	17
1354 GVE 29 SAO JOSE DO RIO PRETO	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	3
1574 GVE 30 JALES	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
1353 GVE 31 SOROCABA	1	0	3	0	2	6	3	9	6	4	5	7	5	51
1575 GVE 32 ITAPEVA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
1352 GVE 33 TAUBATE	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	2	0	6
Total	36	47	72	68	80	79	62	84	103	71	70	113	78	963

Fonte: SINAN-NET

*dados provisórios até 06-02-2020

ANEXO IV

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O projeto de Pesquisa intitulado “Pesquisa de *Rickettsia* sp. em pacientes e carrapatos de Ribeirão Preto utilizando a PCR” tem como pesquisador responsável o médico Felipe Santos de Carvalho (fpscarvalho@hotmail.com, 16-99993-0540). As rickettsioses são doenças presentes em nosso meio, algumas delas transmitidas por carrapatos, e que podem causar febre, dor de cabeça, manchas pelo corpo entre outros sintomas. Pouco se conhece dessas doenças e o objetivo dessa pesquisa é conhecer mais sobre sua presença na região de Ribeirão Preto. Para isso, coletaremos 10ml de sangue sem nenhum prejuízo ou riscos para sua saúde.

Eu _____, abaixo assinado (a), tendo sido devidamente esclarecido, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido.

2. A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do meu tratamento.

3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada a minha privacidade.

4. O compromisso de que será prestada informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade de continuar dele participando.

5. O compromisso de que serei devidamente acompanhado e assistido durante todo o período de minha participação no projeto.

6. Que indenização, a título de cobertura material, para reparação de danos imediatos ou tardios, decorrentes de minha participação na pesquisa, está sujeita as leis vigentes no País, caso ocorra algum dano decorrente de participação no projeto. Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, de de

_____

Assinatura do Paciente

_____

Felipe Santos de Carvalho

Pesquisador Responsável

ANEXO V

QUESTIONÁRIO DE COLETA DE DADOS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

FICHA Nº _____ DATA: _____

NOME: _____ IDADE: _____SEXO: M ( ) F ( )

HC: ( ) REGISTRO _____ OUTRO: ( ) REGISTRO _____

NATURALIDADE: _____ RESIDÊNCIA ATUAL: _____

LPI: _____ OCUPAÇÃO: _____

INÍCIO DOS SINTOMAS: _____ FEBRE: SIM ( ) NÃO: ( )

CEFALEIA: SIM ( ) NÃO: ( ) *RASH*: SIM ( ) NÃO: ( ) TIPO:_____

ESCARA: SIM ( ) NÃO: ( ) OUTROS SINTOMAS: _____

HISTÓRIA DE PICADA DE CARRAPATO SIM ( ) NÃO: ( )

VISITA EM ÁREAS COM CARRAPATOS: SIM ( ) NÃO: ( )

CARRAPATOS NA RESIDÊNCIA: SIM ( ) NÃO: ( )

VISITA EM ÁREA RURAL: SIM ( ) NÃO: ( )

TRABALHO RURAL: SIM ( ) NÃO: ( )

CONTATO COM ANIMAIS: SIM ( ) NÃO: ( ) QUAL(IS)? _____

DATA DA COLETA: _____ AMOSTRA(S): _____

TRATAMENTO NA COLETA: SIM ( ) NÃO: ( ) TEMPO: _____

AMOSTRA IAL SIM ( ) NÃO: ( ) AMOSTRA OUTRO: SIM ( ) NÃO: ( )

INTERNAÇÃO: SIM ( ) NÃO: ( ) TERAPIA ESPECÍFICA: SIM ( ) NÃO: ( )

QUAL? _____ OUTRA? _____

EVOLUÇÃO: _____

ÓBITO: SIM ( ) NÃO: ( ) DIAGNÓSTICO FINAL: _____

OBSERVAÇÕES: _____

ANEXO VI

Monitoramento de Carrapatos Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto

Áreas do Córrego Laureano:

1. USP
2. Imóveis da parte de baixo da Av. do Café
3. Chácaras na Av. Bandeirantes
4. Parque Maurílio Biagi

Áreas do Córrego Ribeirão Preto:

5. Entorno do Horto – Haras do Tchá
6. Imóveis na Av. dos Andradas
7. Hospital Santa Tereza
8. Imóveis na Rua Raphael de Léo
9. Entorno do Condomínio Delboux
10. Imóveis da parte de baixo da Av. Caramuru
11. Av. Álvaro de Lima com Rua Primo Tronco
12. Área atrás do Supermercado Carrefour – Via Norte
13. Ligação da Via Norte com Rua Capitão Salomão
14. Margens da Via Norte

Áreas do Córrego Tanquinho:

15. Chácaras na Av. Barão do Bananal
16. Região do Educandário (Cruzamento entre avenidas Meira Júnior, Paschoal Innecchi e Quito Junqueira)
17. Imóveis da Vila Mariana no entorno no córrego
18. Encontro do Córrego Tanquinho com Córrego Ribeirão Preto na Via Norte

Áreas do Córrego dos Catetos:

19. Imóveis no entorno do Córrego

Áreas do Córrego no Jd Aliança/Jd. João Rossi:

20. Campo de futebol Jd. João Rossi
21. Encontro com a Av. Independência

Áreas no Jd. Olhos D´Água:

22. Entorno do Parque Olhos D´Água

Áreas do Rio Pardo:

23. Clube Regatas
24. Clube Recreativa de Campo