

FEBRE MACULOSA: ISOLAMENTO DE RICKETTSIA EM AMOSTRA DE BIÓPSIA DE PELE.⁽¹⁾

Heloisa Helana B. MELLES (2), Sílvia COLOMBO (2) & Marcos Vinícius da SILVA (3).

RESUMO

Presença de *Rickettsia* na pele de doente de Febre Maculosa foi evidenciada por inoculação intraperitoneal em cobaio.

O diagnóstico sorológico por imunofluorescência indireta revelou diferença de título de anticorpos específicos para *Rickettsia rickettsii*, de 4 vezes entre a 1ª e a 3ª amostra. Imunoglobulina M (IgM) específica foi detectada nas amostras de sangue, evidência de infecção em atividade ou recente.

Foi também detectada a presença de anticorpos específicos para *R. rickettsii* no soro dos cobaios inoculados.

UNITERMOS: Febre Maculosa; *Rickettsia rickettsii*; Rickettsiose-sorologia; Rickettsiose-cultivo.

INTRODUÇÃO

A *Rickettsia rickettsii* é o microrganismo causador da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas. O carrapato é o hospedeiro natural, reservatório e vetor. A infecção no ser humano ocorre pela picada de carrapato infectado; após período de incubação, manifestam-se febre, cefaléia e exantema.³

A Febre Maculosa no Brasil, semelhante à descrita por RICKETTS¹², foi notificada nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná e Bahia¹¹.

Em São Paulo, foi descrita por PIZA et al em 1929¹⁰, sob a denominação de "Tifo exantemático de São Paulo". Em 1951, PEREIRA & TRAVASSOS⁸ concluíram acerca da identidade antigênica da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas e do Tifo de São Paulo.

TIRIBA et al, em 1962¹⁵ estudaram os aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais da Febre Maculosa em 28 pacientes, no período de 1957 a 1962. Posteriormente, os mesmos autores¹⁶ relataram mais 5 casos confirmados de Febre Maculosa.

A Febre Maculosa manifesta-se subitamente com febre, calafrios, prostração, mal-estar, mialgia e cefaléia. Erupção cutânea maculopapular que aparece entre o 2º e o 6º dia nas extremidades, estende-se para o resto do corpo, face e regiões palmar e plantar, é devida a áreas focais de endangeíte¹³.

As provas para diagnóstico laboratorial da Febre Maculosa são: isolamento do agente através da inoculação de sangue em cobaio, ovos embrionados de galinha ou cultura de células; reações de fixação do complemento, ensaio imunoenzimático e a imunofluorescência, mais usada pela sensibilidade e facilidade de execução. O diagnóstico pode também ser estabelecido pela identificação da *Rickettsia* em fragmento de pele obtido por biópsia, entre o 4º e o 8º dia de doença, através da reação de imunofluorescência^{17,5}.

O objetivo do trabalho é a demonstração da possibilidade do diagnóstico etiológico ser feito através do isolamento do agente a partir de amostra

(1) Realizado no Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

(2) Do Instituto Adolfo Lutz - Setor de *Rickettsia*, São Paulo, SP, Brasil

(3) Do Hospital Emílio Ribas, São Paulo, SP, Brasil

Endereço para correspondência: Dra. Heloisa Helena B. Melles, Instituto Adolfo Lutz, Serviço de Virologia-Setor de *Rickettsia*, Av. Dr. Arnaldo, 355, CEP 01246, São Paulo, SP, Brasil.

de biópsia de pele, fato ainda não descrito na literatura internacional.

Descrição de uma ocorrência clínica

A.P.A.O., sexo feminino, branca, 2 anos, procedente de Mogi das Cruzes, SP, foi admitida no Hospital Emílio Ribas em 31/11/1988, apresentando manchas avermelhadas nos membros, cabeça e pescoço. Há 8 dias, febre, cefaléia, irritação na garganta e mancha no local do pescoço onde fora retirado um carrapato. Ao exame físico apresentava-se desidratada, taquipnéica, cianótica, 38,5°C de temperatura, confusão mental. Na pele havia lesões puntiformes avermelhadas disseminadas, observadas também nas palmas e plantas, tronco, abdomen e face.

A coleta de amostras para diagnóstico incluiu a biópsia de pele em local de mácula, além do sangue.

Tratamento: Foi instituída terapêutica com cloranfenicol durante 15 dias, recebendo alta hospitalar em 22/12/1988.

Considerando-se o histórico da doença e a epidemiologia da Febre Maculosa, solicitou-se que fosse enviado sangue dos familiares para pesquisa de anticorpos específicos para *Rickettsia*. Foi colhido sangue do pai A.C.O. de 41 anos, da mãe T.M.O., 40 anos e de 3 irmãos, E.A.O. 9 anos; A.D.O. 14 anos e E.A.O. 17 anos, que foram enviadas ao laboratório no dia 21/12/1988.

MATERIAL E MÉTODOS

Dez mililitros de sangue total obtido por punção venosa foram acondicionados em tubo estéril, sem anticoagulante. Após retração do coágulo separou-se o soro, e do coágulo foi feita suspensão a 20% em solução de SPG (sacarose-fosfato-ácido glutâmico)². O soro foi conservado sob congelamento a -20°C. A suspensão do coágulo foi reservada para tentativa de isolamento.

A biópsia de pele foi realizada em local de mácula. O fragmento foi colocado em tubo contendo solução de SPG imerso em gelo e posteriormente foi macerado em gral de porcelana com pó de vidro estéril para obtenção de suspensão a 20% em SPG², adicionada de 100 U de penicilina e 50µg de estreptomimicina/ml para tentativa de cultivo do agente.

As suspensões de coágulo sanguíneo e fragmento de pele foram inoculadas por via intraperitoneal em cobaias machos, albinos de 300 a 400 g de peso.

Foram feitos controles dessas suspensões para verificação de contaminação bacteriana e fúngica.

Foram colhidas amostras de sangue do 1º, 9º e 17º dias da admissão. As amostras foram processadas simultaneamente pela reação de imunofluorescência indireta (IFI)¹⁷, usando antígeno de *R. rickettsii* extraído de membrana vitelina de ovos embrionados de galinha, antígeno este fornecido pelo CDC (Center for Diseases Control), Atlanta, USA). Diluições seriadas dos soros começaram pelo título 1:16 até 1:4096, com tampão fosfato (PBS) pH 7,6. Às lâminas com antígeno fixado foram adicionadas gotas de cada diluição dos soros. Foram feitos controles de antígeno com PBS e com soro humano positivo e negativo, bem como controles das diluições com membrana vitelina não infectada. Após 30 minutos de incubação a 37°C em câmara úmida, as lâminas foram lavadas com PBS pH 7,6 e secadas ao ar. Adicionaram-se então conjugados para imunofluorescência específicos para IgG e IgM. O título do soro foi considerado como a última diluição que apresentou intensidade de fluorescência de 2 a 4 cruzes e os controles, negativos.

Após 3 meses, foi colhida outra amostra de sangue (4ª) a qual foi igualmente processada por imunofluorescência.

Os soros foram testados também, através da IFI para *Rickettsia typhi*, agente etiológico do tifo murino, usando antígeno específico fornecido pelo CDC.

RESULTADOS

Sorologia

A 1ª amostra de soro colhida no dia 01/12/88 apresentou título de anticorpos IgG específicos para *R. rickettsii* de 1:512 e IgM 1:32. Na 2ª amostra do dia 09/12/88 o título de IgG resultou em 1:1024 e na 3ª amostra de dia 17/12/88 o título foi de 1:2048. Houve, portanto, aumento de título de anticorpos de 4x da 1ª para a 3ª amostra. Quanto à IgM específica para *R. rickettsii* as 3 amostras foram testadas no mesmo dia e os títulos foram de 1:128.

Em relação à pesquisa de anticorpos para **R. typhi**, resultou que nenhuma das 3 amostras de soro apresentou anticorpos para este agente.

No soro dos cobaios sangrados por punção cardíaca, foram detectados anticorpos IgG específicos para **R. rickettsii** em título 1:8. Nesses mesmos soros não foram detectados anticorpos para **R. typhi**.

O cobaio controle não apresentou anticorpos para *Rickettsia*.

Os soros dos familiares da paciente que foram testados tanto para **R. rickettsii** quanto para **R. typhi** não apresentaram qualquer título de anticorpos.

Temperatura dos cobaios inoculados:

Cobaios inoculados com material da pele apresentaram elevação de temperatura enquanto que aqueles inoculados com o coágulo sangüíneo, não. O cobaio controle e os inoculados com coágulo apresentaram temperatura entre 37,0°C e 38,0°C, enquanto que aqueles inoculados com pele tanto na passagem inicial como os da 1ª e 2ª passagens tiveram temperaturas acima de 39,8°C.

Ao exame microscópico dos esfregaços de baço dos cobaios inoculados com pele, corados pelo método de Macchiavello, observou-se microrganismos isoladamente e em grupos, intra e extracelulares, morfológicamente semelhantes às *Rickettsias*.

O baço de um dos cobaios, positivo, foi encaminhado ao CDC (Center for Diseases Control) onde foi novamente inoculado em cobaio e posteriormente em cultura de células Vero. Foram feitas colorações de Gimenez e imunofluorescência indireta com soro imune específico para **R. rickettsii** e confirmada a presença deste microrganismo (Dr. Russel Regnery - informação pessoal). Da *Rickettsia* em questão, está sendo realizado estudo do DNA através da técnica do PCR (polymerase chain reaction).

DISCUSSÃO

Segundo WOODWARD et al¹⁷ é possível a confirmação da Febre Maculosa pela visualização da *Rickettsia* através da imunofluorescência, a par-

tir de biópsia de pele entre o 4º e 8º dia de infecção.

Em 1986, KAPLAN & SCHOEBERGER⁶ em estudo de 1774 casos de Febre Maculosa, nos Estados Unidos, assinalaram alta sensibilidade e especificidade da IFI, razão pela qual o CDC o recomenda como método preferencial de diagnóstico dessa infecção.

A demonstração do título de anticorpos IgG de 1:64 em amostra única de soro ou aumento de 4 x do título entre a fase aguda e de convalescença é confirmatório de Febre Maculosa.

HAYES⁴ em 1985 demonstrou em crianças a presença de IgM específica, precocemente, indicativa de infecção em atividade e confirmatória do diagnóstico etiológico.

No caso apresentado, foi demonstrado pela IFI, além do aumento significativo de título de IgG, presença de IgM em alto título, comprovando a etiologia da infecção pela **R. rickettsii**.

TAYLOR et al, em 1985¹⁴ descreveram possíveis casos de infecção subclínica de Febre Maculosa através de evidências sorológicas. É importante mencionar que os contatos familiares do caso não desenvolveram a infecção nem na forma subclínica.

Segundo PHILIP⁹, eventualmente poderia haver reatividade cruzada entre as *Rickettsias* do grupo da Febre Maculosa e do Tifo. Entretanto, no caso, os soros resultaram negativos frente à **R. typhi**, agente causador do Tifo Murino.

As evidências obtidas pelos exames sorológicos específicos realizados no paciente e nos cobaios inoculados, assim como os achados macroscópicos e microscópicos nos animais inoculados confirmam o diagnóstico etiológico da Febre Maculosa, no paciente estudado.

Sugere-se, portanto, que nos casos suspeitos de Febre Maculosa além da coleta de amostra de sangue para isolamento e reações séricas, seja procedida a biópsia de pele visando seu exame à imunofluorescência e seu preparo para inoculação, como método adicional de diagnóstico. O fato do sangue da paciente ter resultado negativo nas

inoculações em cobaio, foi devido, com muita probabilidade, à presença dos anticorpos circulantes.

Fica portanto registrado mais um caso clínico com confirmação etiológica de Febre Maculosa oriundo de região endêmica de São Paulo.

Note-se também que há cerca de 20 anos não é registrado caso confirmado etiológicamente de Febre Maculosa pelo isolamento e identificação do agente causal e sorologia específica com IgG e IgM positivos em nosso país.

Finalmente é nossa intenção alertar as autoridades sanitárias para o fato de que em nosso país não existem estudos prospectivos para evidenciar a frequência das infecções por *Rickettsias*. No caso da Febre Maculosa, se atentarmos para os achados norte-americanos que mostram cerca de 1425 casos anualmente na década de 80³, confirmados em laboratório, e ainda mais, com as condições de higiene, educacional e médicas vigentes naquele país, permitem facilmente projetar que em nosso meio o número citado seria facilmente ultrapassado. Ademais, a infecção atualmente não é limitada somente às zonas rurais, pois, recentemente, foram constatados inúmeros casos clínicos desta infecção na cidade de New York, onde em parque central foram identificados numerosos carrapatos infectados pela *R. rickettsii*¹⁷. A importância do alerta é correlacionada aos indícios de que atualmente se verifica recrudescimento da incidência de rickettsioses nos Estados Unidos e Europa.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Luis Florêncio de Salles Gomes, pela colaboração e sugestões recebidas na execução e redação deste trabalho.

À Sra. Marina Ortolan, pelo auxílio técnico.

SUMMARY

Spotted fever: *Rickettsia* isolation in skin biopsy sample.

A 2 years old child living in an area of the State of São Paulo, known in the past as endemic for rickettsiosis developed clinical evidences of

spotted fever after a tick bite. *Rickettsiae* were isolated from guinea pigs inoculated with a skin homogenate. In sera tested by indirect immunofluorescence with *Rickettsia rickettsii* standard antigen, IgG specific antibody titers raised from 1:512 in the first sample to 1:2048 in the third one; IgM specific antibody titer was 1:128 in the three samples. Also positive were sera obtained from the inoculated guinea pigs. In the last 20 years no other case of rickettsial spotted fever has been confirmed by isolation of the agent in Brasil. To our knowledge, there are no previous reports of isolation of *Rickettsiae* through inoculation of skin biopsy homogenates.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ELISBERG, B.L. & BOZEMAN, F.M. - Serological diagnosis of rickettsial diseases by indirect immunofluorescence. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 43: 193-204, 1966.
2. ELISBERG, B.L. & BOZEMAN, F.M. - The *Rickettsiae*. In: LENNETTE, E.H. & SCHIMIDT, N.J. - Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. 5th ed. Washington DC, American Public Health Association, 1979. p. 1061-1109.
3. FISHBEIN, D.B.; KAPLAN, J.E.; BERNARD, K.W. & WINKLER, W.G. - Surveillance of Rocky Mountain spotted fever in the United States 1981-1983. *J. infect. Dis.*, 150: 609-611, 1984.
4. HAYES, P.L. - Rocky Mountain spotted fever in children in Kansas: the diagnostic value of an IgM - specific immunofluorescence assay. *J. infect. Dis.*, 151: 369-370, 1985.
5. HERBERT, G.A.; TZIANABOS, T.; GAMBLE, W.C. & CHAPPEL, W.A. - Development and characterization of high-titered, group specific fluorescent antibody reagents for direct identification of *Rickettsiae* in clinical specimens. *J. clin. Microbiol.*, 11: 503-507, 1980.
6. KAPLAN, J.E. & SCHOMBERGER, L.B. - The sensitivity of various serologic tests in the diagnosis of epidemic typhus fever. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 35: 840-844, 1986.
7. ORMSBEE, R.; PEACOCK, M.; PHILIP, R.; FLORDE, J.; GABRE-KIDAN, T. & WRIGTH, L. - Serologic diagnosis of epidemic typhus fever. *Amer. J. Epidem.*, 105: 261-271, 1977.
8. PEREIRA, H.G. & TRAVASSOS, J. - Estudo comparativo das rickettsias da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas e do "Tifo de São Paulo" pela reação de fixação do complemento. *Hospital (Rio de Janeiro)*, 40: 123-129, 1951.
9. PHILIP, R.N.; CASPER, E.A.; ORMSBEE, R.A.; PEACOCK, M.G. & BURGDORFER, W. -

- Microimmunofluorescence test for the study of Rocky Mountain spotted fever and Typhus. *J. clin. Microbiol.*, 3: 51-61, 1976.
10. PIZA, J.T. - Considerações epidemiológicas e clínicas sobre o Tifo Exantemático de São Paulo. In: PIZA, J.T.; MEYER, J.R. & SALLES GOMES, L. Tifo Exantemático de São Paulo. São Paulo, Sociedade Impressora Paulista, 1932, p. 11-119.
 11. PLANK, S.J.; TEIXEIRA, R.S. & MILANESI, M.L. - Febre maculosa em Salvador: descrição de um caso. *Rev. méd. Bahia*, 25: 330-333, 1979.
 12. RICKETTS, H.T. - A micro-organism which apparently has a specific relationship to Rocky Mountain spotted fever. *J. Amer. med. Ass.*, 52: 379-380, 1909.
 13. SILVERMAN, D.J. - Adherence of platelets to human endothelial cells infected by *Rickettsia rickettsii*. *J. infect. Dis.*, 154: 694-700, 1986.
 14. TAYLOR, J.P.; TANNER, W.B.; RAWLINGS, J.A.; BUCK, J.; ELLIOTT, L. B.; DEWLETT, H.J.; TAYLOR, B. & BETZ, G. - Serological evidence of sub-clinical Rocky Mountain spotted fever infection in Texas. *J. infect. Dis.*, 151: 367-368, 1985.
 15. TIRIBA, A. da C.; ZATZ, I.; BASTOS, C.O.; GALVÃO, P.A.A.; SESSO, J.; ALBANO, A. & MARTIRANI, J. - Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais da Febre Maculosa observados no Hospital Emilio Ribas durante o período de 1957-1962. In: CONGRESSO DA ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA, 9, Rio de Janeiro, 1962. *Resumos* p. 102.
 16. TIRIBA, A. da C.; GODOY, C.V.F.; BRITO, T.; JORDÃO, F.M.; PENNA, D. de O. & SOUZA, A.R.T. - Febre maculosa em São Paulo: resultados terapêuticos em alguns casos com Laurilsulfato de tetraciclina. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 10: 256-261, 1968.
 17. WILFERT, C.M.; MacCORMACK, J.M.; KLEEMAN, K.; PHILIP, R.N.; AUSTIN, E.; DICKINSON, V. & TURNER, L.- Epidemiology of Rocky Mountain spotted fever as determined by active surveillance *J. infect. Dis.*, 150: 469-479, 1984.
 18. WOODWARD, T.E.; PEDERSEN, C.E.; OSTER, C.N.; BAGLEY, L.R.; ROMBERGER J. & SNYDER, M.J. - Prompt confirmation of Rocky Mountain spotted fever: identification of *Rickettsiae* in skin tissues. *J. infect. Dis.*, 134: 297-301, 1976.

Recebido para publicação em 26/6/1991
Aceito para publicação em 4/11/1991