

Simone Berger Calic

Comparação do teste de Weil Felix com as provas de reação de imunofluorescência indireta e ensaio imunoenzimático como método de triagem para febre maculosa.

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Minas  
Gerais, como requisito parcial para  
obtenção do grau de Mestre em  
Medicina Veterinária Preventiva.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Aurora M.G.  
Gouveia

Belo Horizonte  
UFMG- Escola de Veterinária  
1996

C153c Calic, Simone Berger, 1959-

Comparação do teste de Weil Felix com as provas de reação de imunofluorescência indireta e ensaio imunoenzimático como método de triagem para febre maculosa / Simone Berger Calic - Belo Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária, 1996.

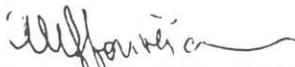
75p. : il.

Dissertação (Mestrado)

1-Febre maculosa das montanhas rochosas-Diagnóstico - Teses. 2 - Rickettsioses - Diagnóstico-Teses. 3 - Ensaio Imunoenzimático - Teses. 4 - Imunofluorescência - Teses. I. Título.

CDD.636.089 692 2

Dissertação defendida e aprovada em 27/03/96, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof.<sup>a</sup> Aurora Maria Guimarães Gouveia  
Orientadora



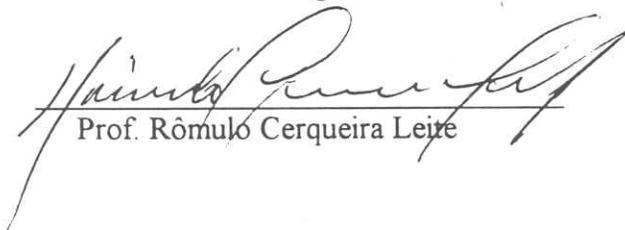
Prof. Márcio Antônio Moreira Galvão



Prof. Romário Cerqueira Leite



Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins



Prof. Rômulo Cerqueira Leite

Aos meus pais Helena e Isaac pela minha formação  
como pessoa e aos meus filhos Ilana e Flávio pelo  
incentivo para prosseguir meu caminho.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

À Dra Aurora M.G. Gouveia , orientadora e amiga, que contribuiu com sua experiência profissional , competência e dedicação, e que com seu exemplo de luta pela vida continuou trilhando comigo até o final deste trabalho contribuindo em minha formação técnica e pessoal.

Ao Dr. Márcio M.A.M. Galvão, pela oportunidade de ingressar neste campo de trabalho e participar do grupo da febre maculosa da FUNED, e por contribuir tecnicamente na co-orientação deste.

Ao professor Romário Cerqueira Leite, que com competência, paciência e carinho, me ensinou os passos a serem seguidos para a realização deste trabalho.

Ao professor Rômulo Cerqueira Leite, pôr ser meu elo inicial com a escola de Veterinária-UFMG, encorajando-me a tentar o mestrado e aceitando seguir ao meu lado como mestre na ciência e na vida.

À professora Celina Maria Modena, pela amizade, carinho e força técnica e espiritual em todos os momentos em que precisei.

Ao meu amigo e colega Nery Cunha Vital, pelo estímulo, companheirismo e incentivo nesta trajetória.

Ao prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins por contribuir pela sua participação na banca examinadora.

Ao Dr. Chequer Buffe Chamone, pela amizade e orientação informal que me foi dada ao longo desta caminhada

Ao Luiz Simeão e Carlos Serufo, integrantes do grupo da FM pela colaboração técnica.

À Benedita pelo apoio ensinando-me boas práticas de conduta e uso do laboratório.

A todos sem excessão do laboratório de sorologia da FUNED, pelo meu treinamento e apoio durante toda a fase experimental do meu trabalho, pela disponibilidade e amizades .

À diretoria de pesquisa da FUNED, nas pessoas de Luiz Guilherme, Cláudia, Carlos e Taís pelo apoio técnico científico.

À divisão de imunobiológicos da FUNED, principalmente Dr. David, Shirley, Gisele e Maurício, pelo apoio e empréstimo de equipamentos sem os quais não poderia concluir este trabalho.

Aos professores e funcionários do departamento de Medicina Veterinária Preventiva, EV-UFMG, pela acolhida quando da realização deste.

Aos colegas de mestrado, que se tornaram grandes amigos, pelo carinho, respeito e confiança.

Aos colegas da divisão de Biologia Médica da FUNED, pela benéfica convivência e apoio.

Ao meu amigo e mestre Moisés Diskin, pela minha iniciação profissional, demonstradas através de sua competência, dedicação e idealismo fundado na moral, persistência e garra, sempre pensando no coletivo, esquecendo-se da sua própria vida.

Às amigas, Moema Reis, Raquel J.Rodrigues, Amália Santana, Maria Helena Gontijo, Vanessa Andréia, Marisa Dayrell, Jovita Gazinelli e Célia Barbosa que contibuiram sempre nos momentos de desânimo e nos momentos de descobertas, ouvindo pacientes e dedicadas, e incentivando esta longa caminhada.

A professora Dra Zélia Lobato, pela amizade antes de tudo, e pela ajuda incondicional neste trabalho e em trabalhos anteriores.

Ao prof. Ivan Barbosa Machado Sampaio, do departamento de zootecnia da EV-UFMG, pela orientação da parte estatística

Ao Sérgio, pela sua visão crítica do mundo e pelo estímulo de buscar o novo.

A Sandra Capistrano, minha guru, mestre da vida, pelo carinho e amizade na trajetória do meu descobrimento e evolução como pessoa.

Aos meus avós pela coragem com que enfrentaram a vida.

Aos meus pais e irmã Paulete, pela segurança familiar, carinho amor e compreensão.

Aos meus filhos, pela paciência, em minha ausência de muitas vezes, e por serem a razão de toda minha esperança e alegria na vida.

“Custa tanto ser uma pessoa plena, que muito poucos são aqueles que têm a luz da coragem de pagar o preço...

É preciso abandonar por completo a busca da segurança e correr o risco de viver com os dois braços.

É preciso abraçar o mundo como um amante.

É preciso aceitar a dor como condição da existência.

É preciso cortejar a dúvida e a escuridão como preço do conhecimento.

É preciso ter uma vontade obstinada no conflito, mas também uma capacidade de aceitação total de cada consequência do viver e do morrer”.

MORRIS L. WEST

## SUMÁRIO

	LISTAS DE TABELAS.....	15
	LISTAS DE GRÁFICOS.....	17
	LISTAS DE FIGURAS.....	18
1.	INTRODUÇÃO.....	23
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	29
2.1.	Diagnóstico laboratorial.....	29
2.2.	Epidemiologia.....	35
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1.	Material.....	36
3.1.1.	Amostragem.....	36
3.2.	Teste de aglutinação.....	36
3.2.1.	Antígeno.....	36
3.2.2.	Placas de vidro.....	37
3.2.3.	Execução da técnica.....	37
3.3.	Imunofluorescência indireta.....	37
3.3.1.	Antígenos.....	38
3.3.2.	Soros controle positivo e negativo.....	38
3.3.3.	Preparação das lâminas.....	38
3.3.4.	Conjugado.....	39
3.3.5.	Execução da técnica.....	39
3.4.	Reação imunoenzimática direta.....	40
3.4.1.	Antígeno.....	40
3.4.2.	Soros controle positivo e negativo.....	40
3.4.3.	Sensibilização das placas.....	40
3.4.4.	Execução da técnica.....	41
3.4.5.	Análise estatística.....	42
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.	CONCLUSÕES.....	70
6.	SUMMARY.....	71
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Soros humanos testados em três técnicas -EIE, RIFI e teste de WF com antígenos de *Proteus* OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub> para diagnóstico de febre maculosa em Minas Gerais, 1995. ....48
- Tabela 2 - Comparações de resultados entre EIE, RIFI, e teste de WF, OX<sub>2</sub> E OX<sub>19</sub> realizado em soros humanos para diagnóstico de febre maculosa em Minas Gerais, 1995. ....49
- Tabela 3 - Resultado comparativo de técnicas de diagnóstico para febre maculosa -EIE, RIFI e WF OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub> realizado em soros humanos, Minas Gerais, 1995. ....50
- Tabela 4 - Resultado dos testes de RIFI e WEIL-FELIX OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub> em soros humanos enviados para diagnóstico de febre maculosa em Minas Gerais, 1995 .....51
- Tabela 5 - Resultados comparativos entre os testes de RIFI e WF OX<sub>2</sub> E OX<sub>19</sub> realizados em soros humanos para diagnóstico de febre maculosa em Minas Gerais, 1995. ....52
- Tabela 6 - Sensibilidade e especificidade do teste de WF OX<sub>2</sub>, em relação ao EIE, Minas Gerais, 1995.....53

- Tabela 7 - Sensibilidade e especificidade do teste de WF OX<sub>19</sub>, em relação ao EIE, Minas Gerais, 1995. ....54
- Tabela 8 - Sensibilidade e especificidade do teste de WF OX<sub>2</sub>, em relação a RIFI, Minas Gerais, 1995.....55
- Tabela 9 - Sensibilidade e especificidade do teste de WF OX<sub>19</sub>, em relação a RIFI, Minas Gerais, 1995.....56
- Tabela 10 - Título de 12 amostras de soros humanos nas técnicas de RIFI e WF OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub> realizados para diagnóstico de febre maculosa em Minas Gerais, 1995. ....57
- Tabela 11 - Distribuição de exames realizados por RIFI com *Rickettsia rickettsii*, enviados pelas DRS e SUS-MG no período de julho/93 a novembro/95. ....58

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Soros humanos testados pelas técnicas EIE e teste de WF com antígenos de *Proteus* OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub> para diagnóstico de febre maculosa em Minas Gerais, 1995. ....59
- Gráfico 2- Comparações de resultados entre EIE com a RIFI, e teste de WF, OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub> realizado em soros humanos para diagnóstico de febre maculosa em Minas Gerais, 1995. ....60
- Gráfico 3- Comparações de resultados entre a RIFI, e os testes EIE e WF, OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub> realizado em soros humanos para diagnóstico de febre maculosa em Minas Gerais, 1995. ....61
- Gráfico 4 - Resultado dos testes de RIFI e WF OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub> em soros humanos enviados para diagnóstico de febre maculosa em Minas Gerais, 1995. ....62
- Gráfico 5 - Resultados comparativos entre os testes de RIFI e WF OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub> realizados em soros humanos para diagnóstico de febre maculosa em Minas Gerais, 1995. ....63

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Reação de imunofluorescência indireta, reação positiva.....	64
Figura 2	Reação de imunofluorescência indireta: reação negativa.....	65
Figura 3	Reação imunoenzimática direta, coloração esverdeada positivo; coloração transparente - negativo.....	66
Figura 4	Mapa de distribuição das localidades onde apareceram casos de febre maculosa no estado de Minas Gerais.....	67

## RESUMO

Palavra chave: febre maculosa, *Rickettsia rickettsii*, *Amblyomma cajennense*

Um total de 671 amostras de soro humano, foram recebidas pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED) de agosto de 1993 a outubro de 1995, provenientes de várias localidades de Minas Gerais, com suspeita clínica de ocorrência de febre maculosa. Estes soros foram testados para avaliar a eficiência do teste de Weil Felix (WF) para triagem em febre maculosa, frente a testes mais sensíveis e específicos como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (EIE). Os resultados obtidos indicaram altos índices de especificidade variando de 85% a 96%, e relativa sensibilidade 50% e 59%. A análise estatística revelou resultado de qui quadrado bem superiores ao valor crítico adotado de 10,38 ( $p < 0,001$ ) demonstrando que há associação entre os testes tanto quando comparados com o EIE, quanto com a RIFI. Estes resultados sugerem que o teste de WF seja recomendável para triagem em FM.

## 1. INTRODUÇÃO

As riquetsioses incluem-se entre as moléstias infecciosas que causaram mais vítimas na história da humanidade. Entre as riquetsioses, a febre maculosa (FM) é a de maior incidência em nosso meio, tendo sido registrada em vários estados brasileiros como Rio de Janeiro, São Paulo, Bahia, Rio Grande do Sul e em maior número em Minas Gerais, adquirindo também importância em razão de sua maior letalidade, sendo causada pela *Rickettsia rickettsii*, e no caso do Brasil transmitida por carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense* (GALVÃO, & RIBEIRO 1993).

O agente etiológico da FM é a bactéria *Rickettsia rickettsii*, da família *Rickettsiae*, de parasitismo intracelular obrigatório. Antigamente as riquetsias eram consideradas microrganismos intermediários entre vírus e bactérias, mas atualmente são considerados procarióticos e catalogadas como bactérias. São Gram negativas, imóveis, multiplicam-se por divisão binária (nos hospedeiros vetebrados ou invertebrados) e após a cura produzem imunidade duradoura (PELCZAR et al, 1981).

São parasitas obrigatórios de artrópodes (pulgas, carrapatos, piolhos e ácaros) aos quais não causam lesões. Geralmente são patogênicas para o homem e transmitidas através da picada de artrópodes.

As riquetsias podem ser classificadas em cinco grupos maiores: grupo do tifo, grupo da febre maculosa, grupo da febre fluvial do Japão, grupo da febre Q e do grupo da febre das trincheiras. (PELCZAR et al, 1981).

Carrapatos são hospedeiros naturais, reservatórios e vetores da FM. O *Amblyomma cajennense* é conhecido como carrapato de cavalos ou carrapato estrela e é encontrado no Brasil, México, Panamá e na Colômbia. É um carrapato trioxeno de pouca especificidade parasitária, principalmente nas fases de larva e ninfa. Na atualidade parasitam principalmente equinos além de bovinos, cães, homens e outros pequenos mamíferos roedores.

São citados como reservatório da *R.rickettsii* principalmente coelhos silvestres, esquilos, gambás e alguns roedores. Entretanto, o nível de riquetsemia desenvolvido é bastante variável entre esses animais, tornando-os mais ou menos importantes na manutenção da doença (McDADE & NEWHOUSE, 1986).

Carrapatos infectados transmitem a doença somente durante o período de alimentação. Estudos de laboratório mostram também que várias espécies de animais particularmente os roedores, transportam a *Rickettsia* e são capazes de transmitir aos carrapatos que se alimentam deles. A transmissão transovariana da doença também ocorre dificultando o controle (U.S.DEPARTAMENT, 1985).

A FM é uma doença infecciosa aguda, febril, às vezes grave, acompanhada de exantema máculo papular de evolução centrípeta que pode tornar-se petequial ou hemorrágica, descamando-se posteriormente.

Durante muitos anos foi confundida com febre tifóide, e nas últimas décadas, com meningococemia.

José Pisa em 1929, em São Paulo, iniciou sua distinção das demais doenças, chegando a demonstrar sua semelhança com a doença "Rocky Mountain Spotted Fever" (RMSF). Apesar da existência de registros da FM em Minas Gerais desde o início do século XVII, poucos trabalhos tem sido descritos no Brasil (GALVÃO, 1988).

Mortes tem ocorrido em áreas urbanas, o que se deve ao fato do aumento de animais domésticos na região peridomiciliar. MAGALHÃES (1952) levanta a hipótese deste tipo de transmissão, onde o cão poderia desempenhar papel importante, ao trazer carrapatos contaminados ou mesmo se infectando em áreas de foco e passando a atuar como reservatório domiciliar

O homem assim como o cão, é um hospedeiro acidental e adquire a doença através da picada do carrapato ou abrasões e lacerações expostas às fezes ou fluidos do carrapato ao ser retirado (HOSKINS, 1991). A FM é uma doença aguda com período de incubação variando entre três e 14 dias, e requer antibioticoterapia bem antes do médico receber resultados confirmatórios do laboratório (WHITE & FLYNN, 1990).

O crescente número de casos clínicos com mortalidade em várias cidades de Minas Gerais, ocasionou aumento do número de análises realizadas na Fundação Ezequiel Dias (FUNED), laboratório oficial para diagnóstico da FM no Estado. Esta demanda obrigou um enorme esforço das equipes de laboratório envolvidas, no fornecimento de um resultado de diagnóstico rápido e seguro da doença em MG. A busca de solução para este súbito aumento na demanda de diagnóstico ocorrido entre os anos de 1993 a 1995, ressaltou a relevância dos testes sorológicos para confirmação do diagnóstico clínico e para diagnóstico diferencial, e levou a verificar, a ausência de dados relativos a padronização das técnicas de diagnóstico no Brasil na literatura consultada.

Em função do alto custo de importação de antígenos de *Rickettsia rickettsii* o teste de soroaglutinação de WF vinha sendo utilizado na rotina, prova esta baseada na reação cruzada entre os antígenos de *Proteus* OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub>, e antígenos de bactérias do gênero *Rickettsia*. Entretanto a positividade dessa reação ocorre também em outras riquetsioses, que não apenas a FM.

O teste é realizado em diluições seriadas, e tem se verificado que alguns casos com títulos iguais ou superiores a 160 têm se confirmado como sendo FM associados a sintomatologia clínica e e reação positiva de imunofluorescência indireta (RIFI).

A realidade existente hoje nos laboratórios regionais de saúde em relação a infra estrutura operacional, não permite a implantação de técnicas de diagnóstico mais complexas, e muitas vezes, nem mesmo procedimentos simplificados são implantados, ou por carência de equipamentos, ou por insuficiência de recursos humanos e também pela ausência de vontade política, sendo toda demanda de apoio laboratorial enviada à FUNED, que é o laboratório de referência da FM no Estado.

Devido a controvérsias entre a literatura estudada e algumas observações feitas por técnicos da FUNED em relação ao teste de WF, e por ser este um teste simples, de custo inferior aos outros testes, de fácil implantação e leitura ao nível de campo, este trabalho teve como objetivo verificar a eficiência do teste de WF para triagem em FM comparado com testes mais sensíveis e específicos, como a RIFI e o ensaio imunoenzimático (EIE), possibilitando melhoria da vigilância epidemiológica da FM no Estado a partir da descentralização do diagnóstico laboratorial.

A comprovação da eficiência do teste de WF como triagem para FM, possibilitaria a descentralização do teste, diminuindo a demanda da FUNED, que cumpriria a função comprobatória do diagnóstico, utilizando metodologia com maior nível de complexidade, podendo investir no aprimoramento tecnológico e de pesquisa aplicada. No caso de FM, o doente deve ser tratado antes da confirmação laboratorial, tornando o teste de triagem importante no direcionamento clínico. Outra vantagem da implantação do WF como triagem ao nível regional, seria a melhoria dos custos operacionais através do SUS (Sistema Único de Saúde), além do aperfeiçoamento de recursos humanos na Saúde, melhorando a notificação da doença como ferramenta epidemiológica no estudo da prevalência da FM no Estado.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Diagnóstico laboratorial

Vários trabalhos discutem a eficiência do Weil-Felix como teste de diagnóstico.

HERSEY et al (1957) sugerem que frequentemente as infecções riquetsiais sejam tratadas precocemente com tetraciclina ou cloranfenicol, levando a resposta normal dos anticorpos a aparecer tardiamente, com baixos títulos, não detectáveis pela fixação de complemento (FC).

OSTER et al (1977) reportam um estudo em nove pacientes com infecção por FM adquirida em laboratório, analisados no período de 1971 a 1976, demonstrando que o teste de WFOX<sub>19</sub> apresentou títulos em cinco de seis pacientes, o WFOX<sub>2</sub> em um de cinco pacientes, o teste de FC em cinco de nove amostras, o teste de microaglutinação (MA) em cinco de oito amostras e a RIFI em todas as oito amostras. Segundo os autores, diagnósticos em procedimentos clínicos muitas vezes recaem sobre o teste de WF e o teste de FC, e sugerem que o teste de FC seja utilizado em associação com outros testes, e que o WF pode ser incluído em todos os casos suspeitos de FM.

HATTWICK et al (1976), reportaram que casos confirmados somente no teste de WF são indistinguíveis clínica ou epidemiologicamente, de casos confirmados pela FC e isolamento de *Rickettsia*, demonstrando a inviabilidade do uso do teste de WF, sugerindo que em função da melhor especificidade e sensibilidade do teste de FC, este deveria ser utilizado preferencialmente ao teste de WF.

PHILIP et al (1977), comparando vários métodos de diagnóstico sorológicos para FM, utilizaram o teste de aglutinação de WF, *Proteus* OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub>, e como positivos consideraram um simples título  $\geq 160$  ou um título quatro vezes maior de anticorpos no soro. Os autores citam que experiências com os testes de RIFI, hemoaglutinação (HA), e microaglutinação (MA) por outros laboratórios são necessárias, e que até que a especificidade destes testes esteja completamente avaliada, é prematuro sugerir que um ou outro deles possam substituir o FC e o WF para o diagnóstico de rotina da FM.

HECHEMY et al (1979) demonstram que somente 4,2% de 284 amostras simples e 17,6% de 51 amostras pareadas foram reativas no teste de aglutinação de WF que foram confirmados pelo específico RIFI para *R.rickettsii*.

PLANK et al (1979) em teste de aglutinação WF realizado com amostras de soro colhidas no 11º dia da doença encontraram resultados negativos. Com amostras de soro colhidas no 16º dia o teste de WF (OX<sub>19</sub>) foi positivo com títulos de 400. Na RIFI os soros positivos apresentaram títulos de até 512 para anticorpos tipo IgG e títulos de 256 para anticorpos do tipo IgM, confirmando doença do grupo da FM.

A incidência de FM aumentou perto de cinco vezes desde 1960. Em 1977 houve aumento de 19% em relação a 1976. Esta elevação dos casos atuais e casos suspeitos aumentaram a demanda do diagnóstico laboratorial. Entre os testes rotineiramente utilizados citam-se o WF e FC. O teste de WF é simples mas não é específico, e demonstra alta percentagem de resultados falsos positivos e resultados falso negativos com diagnósticos clínicos de FM. O teste de FC é específico, é trabalhoso e perde em sensibilidade. O teste de RIFI, que utiliza o antígeno de *R.rickettsii*, tem considerável valor sorológico em riquetsias, mas requer habilidade técnica e equipamentos caros (HECHEMY et al, 1980).

Para determinarem a especificidade e sensibilidade dos testes de WF, HA, FC e imunofluorescência de biópsia de pele em hospital, WALKER et al (1980) investigaram durante o ano de 1978, 142 amostras de soros e 16 biópsias de peles em pacientes com suspeita de FM. Na fase aguda a sensibilidade foi de 70% para a biópsia de pele, 65% para o WF-OX<sub>19</sub>, 19% para o HA, 18% para o WF-OX<sub>2</sub> e de 0% para o FC. A taxa global para a especificidade foi de 100% para biópsia de pele, 99% para HA, 96% para o WF-OX<sub>2</sub> e 78% para o WF-OX<sub>19</sub>. Os autores citam que a comparação é mais eficaz na fase aguda, e destacam que apesar da reação de WF ser relativamente sensível a utilização da titulação simples, aliada a especificidade de somente 78% para o WF OX<sub>19</sub> com resultados falso positivos para FM, possibilitam erro no diagnóstico, demonstrando assim que o critério de títulos pareados com aumento de quatro vezes é mais preciso.

D'ANGELO et al (1982) tendo em vista o aumento da incidência da FM nos EUA durante duas décadas, levantaram dados epidemiológicos de 1975 a 1978, dando especial atenção a incidência por idade como fator de risco nos estados onde a doença era mais comum. A confirmação dos casos foi definida através de alguns critérios: 1- Títulos de anticorpos pela RIFI, MA, FC ou títulos de anticorpos para *Proteus* OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub> (WF); 2- Doença clinicamente compatível e um simples título pelo teste de WF, FC, RIFI ou MA ; 3- Isolamento de *R. rickettsii* de sangue ou amostras de biópsia de tecidos; 4- Imunofluorescência positiva de amostra de pele ou tecido de órgãos de pacientes com casos clinicamente positivos.

MANCINI et al (1983) citam que o diagnóstico pelo método de WF (OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub>) poderia apenas indicar se se trata de um caso provável de FM.

Trabalhos sobre sorologia do "Center of Diseases Control" (CDC) de 1981 a 1984 revelaram que a RIFI foi substancialmente mais sensível (94%) que os outros testes incluindo o *Proteus* OX<sub>19</sub> (70%) e o OX<sub>2</sub> (47%) (KAPLAN & SCHONBERGER, 1986).

GREENE (1987) relata que aglutinação do soro pelo teste de WF classicamente tem sido usada como triagem para a infecção, e que pela falta de sensibilidade e especificidade do teste, somente títulos maiores que 80 sugerem infecção recente. Títulos de anticorpos não são sempre detectáveis na primeira amostra do paciente, e podem não ser altos porque precisam de uma a três semanas para desenvolver a taxa máxima de anticorpos do tipo IgG. Em humanos a utilização de tetraciclina precocemente no curso da doença, pode reduzir a magnitude da resposta sorológica, que de outro modo poderia ser detectada. O cloranfenicol pode frustrar o aumento da concentração de anticorpos que são detectados nas infecções de

cães e interferir com o sorodiagnóstico. A tetraciclina no entanto tem um efeito menor com relação ao sorodiagnóstico.

De acordo com WALKER & PEACOCK (1988), o teste de aglutinação WF (*Proteus* OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub>) é arcaico, de baixa sensibilidade e especificidade, não sendo mais aceito pelo "CDC" como de valor confirmatório de FM, sendo suplantado por novos testes sorológicos.

O teste de FC, usado desde 1940 era o mais específico e foi usado por décadas, mas a baixa sensibilidade, particularmente quando antibióticos são administrados precocemente no curso da doença, o fez perder espaço para a RIFI, mais sensível e altamente específica e que tem sido usada pelos departamentos estaduais de saúde nos Estados Unidos (KAPLAN & SCHONBERGER 1986).

No início da doença FM, o teste de RIFI detecta títulos em um período de sete a dez dias. É um teste que tem a sensibilidade de 95% em amostras pareadas. Segundo estudos realizados no CDC, o teste de RIFI para FM é específico, sem resultados falso-positivos em títulos iguais ou superiores a 64. Há tendência a um consenso de que a RIFI seja o teste padrão em excelência entre os testes de diagnóstico sorológico sendo que para ser reproduzido necessita de pequenas quantidades do escasso antígeno de *Rickettsia* (WALKER & PEACOCK, 1988).

Segundo WALTER & PEACOCK (1988), em amostras não pareadas de soro, títulos de 160 no WF, não são significativos para diagnóstico de FM.

De acordo com WHITE & FLYNN (1990), a soroconversão foi obtida pela RIFI (60,3%), testes de *Proteus* OX (32,7%), teste de FC (4,5%) e teste de MA, LA e IHA (1,9%).

Testes que tem sido utilizados para diagnóstico de FM em cães incluem o WF, FC, RIFI, HA, LA e o MA. O teste de WF foi primeiramente utilizado em 1920, e baseado na soroaglutinação de antígenos de *Proteus* com anticorpos antiriquetsiais. É relativamente não específico e sensível comparado com outros testes avaliados. O nível de títulos simples indicativos de doença, variam de acordo com as regiões dos EUA e pela metodologia utilizada pelos laboratórios. Nos estados do oeste dos EUA, RIFI-IgG sugerem infecções recentes com títulos maiores que 128, mas nos estados do leste títulos maiores que 512 são necessários para implicar em doença ativa. Isto é postulado pela diferença nas cepas de *Rickettsia rickettsii* nas várias regiões. Estudos comparativos de vários métodos diagnósticos pela sorologia, demonstraram que a RIFI tem uma sensibilidade de 94%, com testes considerados positivos com títulos maiores que 128. Antibioticoterapia precoce não afeta este teste, entretanto afeta o teste de FC (COMER, 1991). HOSKINS (1991), também confirma essas variações no título conforme a região dos EUA.

FISHBEIN (1992) cita que o WF não deve ser utilizado por apresentar baixa sensibilidade e especificidade, citando ainda a RIFI como teste mais sensível e específico, e o EIE como satisfatório.

GREENE et al (1993) cita que a relativa alta sensibilidade (58%) e especificidade (83%) do LA pode ter valor como teste de triagem para diagnóstico de FM em cães.

Segundo JONES et al (1993), o teste de EIE para detecção de riquetsioses foi desenvolvido como um método alternativo à RIFI, sendo mais rápido, menos complicado e mais objetivo. A mesma reação cruzada encontrada na imunofluorescência era observada no EIE, mas observou-se que a eliminação da proteína riquetsial e o uso de lipopolissacarídeos remanescentes como antígeno poderia eliminar o problema.

## 2.2.Epidemiologia

O nordeste mineiro é a região com maior número de casos no Estado, estando relacionado com perfil epidemiológico da região, com o processo de ocupação e a transformação do espaço geográfico ocorrido na mesma (GALVÃO, 1988).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Amostragem

Foram testadas 671 amostras de soro humano, recebidas pela FUNED de agosto 1993 a outubro de 1995, provenientes de várias localidades do Estado de Minas Gerais com suspeita clínica de ocorrência de FM, utilizando-se as técnicas de WF e RIFI. Do total das amostras, 130 foram testadas adicionalmente pela técnica de EIE.

Os soros recebidos foram identificados, estocados em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização das provas. Os soros após testados foram estocados em freezer para formação de um banco de soros para eventuais pesquisas que se fizerem necessárias nesta área de trabalho.

#### 3.2. Teste de aglutinação ( WEIL & FELIX, 1916 )

##### 3.2.1. Antígeno

Foram utilizados antígenos Bacto-Proteus OX<sub>2</sub> e Bacto-Proteus OX<sub>19</sub>\*, preparados com cepas imóveis de *Proteus vulgaris*.

---

\*DIFCO, Maryland, EUA.

### 3.2.2. Placas de vidro

Foi utilizada a aglutinação semiquantitativa em placa de vidro, subdividida em quadrados de forma semelhante a placa de Hudleson utilizada no teste de brucelose.

### 3.2.3. Execução

O soro dos pacientes e a suspensão de *Proteus OX<sub>2</sub>* e *OX<sub>19</sub>* foram colocados na placa juntamente com um soro controle positivo e um soro controle negativo para *Rickettsia rickettsii*.

Foram feitas diluições duplas seriadas de 1:20 a 1:320 dos soros frente a volume constante de antígeno (30µl). O soro foi homogeneizado com o antígeno com auxílio de um palito, continuando a homogeneização com movimentos circulares da placa por dois minutos, praticando em seguida a leitura das reações.

O título do soro foi expresso como o inverso da maior diluição que apresentou aglutinação nítida. Foram considerados positivos os soros com títulos  $\geq 80$ .

### 3.3. Imunofluorescência indireta

A imunofluorescência indireta foi utilizada segundo padronização da "Division of Viral and Rickettsial Diseases, National Center for Infection Diseases" CDC, Atlanta, USA (DIVISION, s.d.).

### 3.3.1. Antígenos

O antígeno de *Rickettsia rickettsii* foi gentilmente cedido pelo CDC, Atlanta, USA, em frascos com alíquotas de 0,3 ml de suspensão contendo 0,1% de azida sódica como preservativo, e foram acondicionados até sua utilização em congelador à -20°C. Na hora do uso, foram retirados do congelador e reconstituídos com 0,3 ml de PBS, pH 7,6. Os antígenos reconstituídos não utilizados foram novamente congelados a -20°C sendo reutilizados por mais uma vez.

### 3.3.2. Soros controle positivo e negativo

Como controle positivo foram utilizados soros de pessoas convalescentes para FM, com títulos maiores ou iguais a 128, e soros sabidamente não reativos para FM pela RIFI, como controle negativo.

### 3.3.3. Preparação das lâminas

Lâminas contendo 12 orifícios foram lavadas com sabão neutro, enxaguadas, fervidas por 15 minutos e colocadas para secar em estufa a 37°C. O antígeno foi descongelado à temperatura ambiente, homogeneizado, e com um tubo capilar foi colocada uma gota no centro de cada orifício. Após secagem à temperatura ambiente, as lâminas foram fixadas com acetona fria a -20°C por um período de 12 horas e após secagem à temperatura ambiente, foram colocadas em porta lâminas, embrulhadas em papel alumínio e colocadas no congelador até serem utilizadas. Uma vez descongeladas para uso, se não utilizadas, não eram recongeladas.

### 3.3.4. Conjugado

Foi utilizado conjugado, Fluoline G\* (globulina de carneiro anti IgG humanas marcada pelo isotiocianato de fluoresceína), a 1:100 diluídos a 1:10.000 em solução azul de Evans para contraste. O título do conjugado foi determinado por titulação em bloco frente a soro padrão positivo e negativo.

### 3.3.5. Execução

A lâmina foi retirada do congelador e colocada para secar em temperatura ambiente. Com pipeta graduada de 50µl, foram colocados aproximadamente 10µl de soros em diluições duplas seriadas em tampão fosfatado (PBS 0,01M, pH 7,6) de 1:32 a 1:512, em cada orifício, e soros controle positivo e negativo apenas na diluição de 1:32. A lâmina foi incubada em câmara úmida por 30 minutos a 37°C, e lavada por duas vezes em cubas contendo PBS 0,01M, pH 7,6, com agitador por cinco minutos. A lâmina foi colocada para secar à temperatura ambiente. Foram colocados aproximadamente 0,01 µl de conjugado em cada um dos 12 orifícios da lâmina, que foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C, e lavadas por duas vezes em cubas contendo PBS, 0,01M, pH 7,6 com agitador por cinco minutos. Em seguida foi feita uma rápida passagem da lâmina por cuba contendo água destilada, sendo colocada para secar em temperatura ambiente. Foi colocado em cada um dos 12 orifícios da lâmina com pipeta graduada uma gota de aproximadamente 0,01µl de glicerina tamponada 0,02M, pH 9,0 colocando em seguida a laminula. As lâminas foram examinadas em microscópio Olympus CBA com sistema fluorescente, com lâmpada HBO 200, no aumento de 40 vezes.

---

\*BIOLAB, Jacarepaguá, RJ, Brasil.

O título do soro foi expresso como o inverso da maior diluição que apresentou fluorescência característica. Foram considerados positivos os soros com títulos  $\geq 64$  (DIVISION, s.d.).

### 3.4. Reação imunoenzimática direta ( JONES et al 1993)

#### 3.4.1. Antígeno

Antígeno lipoporissacarídeo de *Rickettsia* e linhagem celular contínua de rim de macaco (VERO), foram gentilmente cedidos pelo CDC, Atlanta, USA, em frascos, previamente diluídos, estocados em geladeira até serem utilizados nos testes.

#### 3.4.2. Soros controle positivo e negativo

Foram utilizados soros de pessoas convalescentes de FM como controle positivo e soros sabidamente não reativos para FM no RIFI como controle negativo.

#### 3.4.3. Sensibilização das placas

Microplacas de poliestireno\*, com 96 microtubos, fundo em U, e capacidade de 300 $\mu$ l por microtubo foram divididas ao meio no sentido vertical e sensibilizadas com 100 $\mu$ l/microtubo dos antígenos LPS rickettsia em uma das metades e células VERO na outra, diluídos a 1:1000 em tampão de cobertura (PBS 0,01M, pH 7,4) com 100 $\mu$ l/microtubo. A seguir as microplacas foram incubadas "overnight" a + 4°C, em câmara úmida sendo utilizadas a medida da necessidade do experimento.

---

\*DYNATECH, Chantilly, Virginia, USA

#### 3.4.4. Execução da técnica

As placas sensibilizadas com o antígeno foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem (PBS 0,01 M, pH 7,4, acrescido de 0,1% de Tween 20) e secas a temperatura ambiente. Em seguida, 100 µl de diluente EIE ( PBS 0,01M, pH 7,4 acrescido de 0,1% de Tween 20 e 5% de leite em pó desnatado) foram adicionados em cada microtubo com objetivo de cobrir os espaços livres da fase sólida (bloqueio). Após incubação durante 30 minutos a 37°C em câmara úmida as placas foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem, procedendo a secagem da placa à temperatura ambiente. Os soros teste e soros controle positivos e negativos, diluídos em diluente EIE a 1:100, foram colocados na placa da seguinte maneira: na primeira coluna oito soros controles negativos em diluição constante de 1:100; na segunda coluna, diluições seriadas duplas a partir de 1:100 do soro controle positivo; a partir da terceira coluna os soros teste na diluição 1:100 em duplicata no sentido horizontal, até a metade da placa. Repetindo-se o mesmo procedimento na segunda metade da placa contendo a célula VERO, com os mesmos soros na mesma posição. Após incubação durante uma hora a 37°C em câmara úmida as placas foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem como descrito anteriormente. Em cada orifício foram então colocados 100 µl de conjugado “horseradish peroxidase” (anticorpos anti IgG humana conjugado à peroxidase)\* na diluição 1:2000 em diluente EIE, seguindo-se nova incubação por uma hora em câmara úmida. Após essa incubação as placas foram lavadas em tampão de lavagem por cinco vezes sendo a seguir adicionados 100 µl por orifício do substrato 2,2'-azino-di[3-ethylbenzothiazoline sulfonate(6)] (ABTS), que foi preparado adicionando quantidades iguais da substância A com a substância B de acordo com o número de placas utilizadas, homogeneizando bem a mistura.

---

KPL, Gaithersburg, MD, USA.

A preferência por este substrato foi pela coloração azul esverdeada que facilita a leitura visual. As placas foram incubadas em câmara úmida, em estufa 37°C por 15 minutos. A reação não foi interrompida, e então procedeu-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda (DO) de 405 nm e a interpretação dos resultados, fazendo-se a diferença entre os dados obtidos no lado da placa contendo o LPS rickettsia e o lado da placa contendo as células VERO, tirando então o ponto de corte por placa.

#### 3.4.5. Análise estatística

As associações entre variáveis qualitativas foram analisadas através do teste do qui-quadrado, ao nível de significância de 0,1%. A avaliação da sensibilidade e especificidade foi efetuada de acordo com HOEL (1981).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 e gráfico 1 estão relacionados os resultados dos soros humanos realizados pelos testes de EIE, RIFI e WF antígenos de *Proteus* OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub>, demonstrando respectivamente 36,92%, 28,46%, 23,80 e 26,15% de positividade nos testes. Verificou-se resultado ligeiramente mais significativo do WF OX<sub>19</sub> em relação ao OX<sub>2</sub>, concordando com WALKER et al (1980), KAPLAN & SCHONBERGER (1986), WALKER & PEACOCK (1988) que também encontraram maior positividade de OX<sub>19</sub> em relação ao OX<sub>2</sub>.

Na tabela 2, gráficos 2 e 3 foram demonstrados resultados comparativos entre os testes verificando-se 24,6% de concordantes positivos entre EIE/RIFI, 18,5% entre EIE/OX<sub>2</sub>, 20% EIE/OX<sub>19</sub>, 17,7% RIFI/OX<sub>2</sub>, 19,3% entre RIFI/OX<sub>19</sub>, e 20,8% entre OX<sub>2</sub>/OX<sub>19</sub> com concordância maior do teste WF OX<sub>19</sub> em relação ao OX<sub>2</sub>, quando comparado tanto pelo EIE, quanto pela RIFI.

Na tabela 3 é demonstrada a comparação entre as três técnicas e a concordância entre elas. Foi verificada uma concordância igual entre os testes de WF OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub>, tantos nos resultados coincidentes positivos quanto nos resultados coincidentes negativos. Dos 48 soros positivos pelo EIE, 14 foram negativos nas outras técnicas (RIFI e WF). Na literatura consultada não foram encontrados resultados comparativos entre EIE e RIFI, podendo-se inferir baseado em dados de sensibilidade do EIE frente a outros antígenos que ela seja uma prova mais sensível. Entretanto o teste à época dos exames estava sendo implantado e padronizado e a falta de reagente

impossibilitou a repetição dos testes, não permitindo portanto uma afirmação definitiva desta maior sensibilidade.

Os resultados dos testes de RIFI e WF OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub> demonstraram em relação a positividade respectivamente 8,0%, 10,0% e 18,3%, demonstrando uma percentagem maior de resultados positivos no teste OX<sub>19</sub> e uma percentagem maior de resultados negativos do OX<sub>2</sub> (90,0%) em relação ao OX<sub>19</sub> (82,7%) quando comparados a RIFI (92,0%) conforme demonstram a tabela 4 e gráfico 4. WALKER et al (1980) também encontraram sensibilidade maior do OX<sub>2</sub> em relação ao OX<sub>19</sub> na fase aguda da doença.

Em relação aos resultados comparativos entre os testes RIFI e WF OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub> (tabela 5 e gráfico 5), obtivemos percentuais de concordância entre os positivos muito semelhantes entre os testes de WF OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub>. Já os resultados coincidentes negativos mostraram um percentual maior na comparação entre a RIFI/OX<sub>2</sub> (86,5%) e a RIFI/OX<sub>19</sub> (78,4%). WALKER & PEACOCK (1988), encontraram especificidade para o *Proteus* OX<sub>19</sub> de 78% igual a encontrada neste trabalho, e de 96% para o *Proteus* OX<sub>2</sub>, concordando em sua maior especificidade em relação ao OX<sub>19</sub>.

Os índices de sensibilidade (50%) e especificidade (91%) do teste de WF OX<sub>2</sub> avaliados pelo EIE estão apresentados na tabela 6. A análise estatística entre os achados do EIE, como testes padrão, e o WF OX<sub>2</sub> revelou qui quadrado de 28,66 (p<0,001), superior ao valor crítico adotado (10,38), demonstrando que foi rejeitada a hipótese da nulidade e aceita a hipótese alternativa de que há associação entre os testes.

Na tabela 7 foi demonstrada sensibilidade do teste WF OX<sub>19</sub> (54%) e especificidade (90%) em relação ao teste EIE como padrão. A análise estatística apresentou um qui quadrado de 30,91 (p<0,001) maior que o valor crítico adotado (10,38), rejeitando a hipótese da

nulidade e aceitando a hipótese alternativa de que há associação entre os testes.

Com a RIFI como teste padrão encontramos no teste de WF OX<sub>2</sub>, sensibilidade de 57% e especificidade de 94%, e um qui quadrado de 146,93 ( $p < 0,001$ ) superior ao valor crítico adotado (10,38), rejeitando a hipótese da nulidade e aceitando a hipótese alternativa de que há associação entre os testes, conforme demonstrado na tabela 8. WALKER et al (1980), em estudos realizados comparando resultados entre várias técnicas, encontraram sensibilidade de 18% e especificidade de 96% para o teste de WF OX<sub>2</sub> concordando na especificidade e divergindo na sensibilidade com os resultados obtidos neste trabalho. Os autores consideram positivos títulos acima de 160 explicando a menor sensibilidade encontrada.

Utilizando o RIFI como teste padrão encontramos sensibilidade de 59% e especificidade de 85% para o teste de WF OX<sub>19</sub> (tabela 9). A análise estatística apresentou um qui quadrado de 65,72 ( $p < 0,001$ ) maior que o valor crítico adotado (10,38), rejeitando a hipótese da nulidade e aceitando a hipótese alternativa de que há associação entre os testes. WALKER et al (1980) encontraram sensibilidade de 65%, de 78% próximas as encontradas neste trabalho.

GREENE (1987) relata que a aglutinação do soro pelo teste de WF tem sido utilizada como triagem, que somente títulos altos (>80) sugerem recente infecção, e que o teste falta em sensibilidade e especificidade, contrariando os resultados encontrados nas tabelas 6, 7, 8 e 9 que nos mostram uma alta especificidade do teste WF OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub>, e um valor significativo para a sensibilidade, verificando semelhança nos resultados obtidos quando utilizamos o EIE ou o RIFI como teste padrão, sugerindo que o teste de WF seja útil para triagem em FM. A alta especificidade nos leva a alguns resultados falso positivos que no caso de teste de triagem é de irrelevante importância.

Devido a maior sensibilidade do teste OX<sub>19</sub> e maior especificidade do OX<sub>2</sub>, sugerimos que se faça concomitantemente os dois testes para triagem melhorando assim a qualidade do teste de WF.

GREENE et al (1993) cita a relativamente alta sensibilidade (58%) e especificidade (83,6%) do teste de latex aglutinação (LA) como teste de triagem para diagnóstico de FM em cães. Confrontando com dados obtidos nesse trabalho com sensibilidades de 50%, 54%, 57% e 59% e especificidade de 91%, 90%, 94%, e 85% respectivamente nas tabelas 6, 7, 8, e 9 encontramos dados semelhantes em relação à sensibilidade e melhores quanto à especificidade, sugerindo o WF para humanos, como um bom teste para triagem em FM.

Dos 671 soros testados 12 (1,78%), reagiram no teste de WF OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub> com títulos iguais ou menores que 80 (tabela 10), mas foram positivos pela RIFI, sugerindo que na utilização do teste de OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub>, como método de triagem para FM, não se deve descartar títulos iguais ou menores que 80, contrariando PHILIP et al (1977), HECHEMY et al (1979), KAPLAN & SCHONBERGER (1986), GREENE (1987), WALKER & PEACOCK (1988) que indicam títulos iguais ou maiores que 160.

É importante destacar que a maioria dos trabalhos encontrados discutem o teste de WF em relação a outras técnicas como prova de diagnóstico e não como um método de triagem para FM.

De acordo com COMER (1991), títulos simples indicativos de doença, variam de acordo com regiões dos EUA e pela metodologia utilizada pelos laboratórios. Nos estados do oeste dos EUA, RIFI-IgG sugerem infecções recentes com títulos maiores que 128, mas nos estados do leste, títulos maiores que 512 são necessários para implicar em doença ativa. Isto é postulado pela diferença nas cepas

de *Rickettsia rickettsii*. HOSKINS (1991), também relata essas variações no título conforme a região dos EUA.

A carência de estudos no Brasil em comparação de técnicas de diagnóstico sorológicos dificulta a discussão sobre a variação das cepas de *Rickettsia rickettsii*, mas não se pode descartar a possibilidade das diferenças dos resultados de sensibilidade e especificidade obtidas neste estudo divergirem de outros autores devido a variação da cepa.

HERSEY et al (1957) cita que as infecções riquetsiais são tratadas precocemente com tetraciclina ou cloranfenicol, levando a resposta normal dos anticorpos a aparecer tardiamente, com baixos títulos e no caso de FC não são detectáveis. GREENE (1987) cita que em humanos a utilização de tetraciclina precocemente no curso da doença pode reduzir a magnitude da resposta sorológica. O cloranfenicol pode frustrar o aumento da concentração de anticorpos que são detectados nas infecções de cães e interferir com o sorodiagnóstico; a tetraciclina no entanto tem um efeito menor com relação ao sorodiagnóstico.

Devido ao preenchimento inadequado das fichas epidemiológicas que não têm caráter de notificação compulsória, não foi possível verificar alguma relação entre o uso de antibióticos e sua interferência no resultado dos testes. Estudos deveriam ser realizados para verificar esta possibilidade.

A tabela 11 mostra a distribuição da FM no Estado e percentagem de positividade em relação ao número de amostras enviadas pelas Diretorias Regionais de Saúde-SES-MG para diagnóstico. A distribuição pode ser observada também na figura 3. O nordeste mineiro é a região com maior número de casos no Estado, estando relacionado com perfil epidemiológico da região, com o processo de ocupação e a transformação do espaço geográfico ocorrido na mesma (GALVÃO, 1988).

Tem-se observado que a melhoria da resposta laboratorial e informações da doença, tem aumentado o número de notificações de casos em várias regiões do Estado, levando a uma tendência de aumento de casos em regiões que até então desconheciam a existência de FM, como o caso de Juiz de Fora onde apareceram recentemente dois resultados positivos para a doença.

Com a utilização do teste de Weil-Felix como triagem, pode-se levar esta análise sorológica ao nível de campo, que poderá ocasionar uma detecção real da prevalência da doença no Estado.

Tabela 1 - Soros humanos testados em três técnicas EIE, RIFI e teste de WF com antígenos de *Proteus* OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub> para diagnóstico de FM em Minas Gerais, 1995.

Resultado	EIE	%	RIFI	%	OX <sub>2</sub>	%	OX <sub>19</sub>	%
Positivo	48	36,9	37	28,5	31	23,8	34	26,1
Negativo	82	63,1	93	71,5	99	76,2	96	73,9
Total	130	100,0	130	100,0	130	100,0	130	100,0



Tabela 3 - Resultado comparativo de técnicas de diagnóstico, EIE, RIFI e WF OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub> para FM realizado em soros humanos, Minas Gerais, 1995.

Resultado	EIE/RIFI/OX <sub>2</sub>	%	EIE/RIFI/OX <sub>19</sub>	%
Coincidentes:				
Positivo	23	17.7	23	17.7
Negativo	71	54.6	71	54.6
Divergentes:				
(+) (+) (-)	10	7.7	9	7.0
(+) (-) (-)	14	10.8	13	10.0
(+) (-) (+)	2	1.5	3	2.3
(-) (-) (+)	6	4.6	6	4.6
(-) (+) (+)	1	0.0	2	1.5
(-) (+) (-)	4	3.0	3	2.3
Total	130	100.0	130	100.0

Tabela 4 - Resultado dos testes de RIFI e WF OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub> em soros humanos enviados para diagnóstico de FM em Minas Gerais, 1995

PROVAS	RIFI	%	OX <sub>2</sub>	%	OX <sub>19</sub>	%
Positivo	54	8,0	67	10,0	123	18,3
Negativo	617	92,0	604	90,0	548	81,7
Total	671	100,0	671	100,0	671	100,0

Tabela 5 - Resultados comparativos entre os testes de RIFI e WF OX<sub>2</sub> E OX<sub>19</sub> realizados em soros humanos para diagnóstico de FM em Minas Gerais, 1995.

Resultados	OX <sub>2</sub> /OX <sub>19</sub>	%	RIFI/OX <sub>2</sub>	%	RIFI/OX <sub>19</sub>	%
Coincidentes						
Positivo	50	7.45	31	4.61	32	4.76
Negativo	531	79.13	581	86.58	526	78.39
Divergentes						
(+) / (-)	17	2.53	23	3.42	22	3.27
(-) / (+)	73	10.87	36	5.37	91	13.56
Total	671	100.0	671	100.0	671	100.0

Tabela 6 - Sensibilidade e especificidade do teste de WFOX<sub>2</sub>, em relação ao EIE, Minas Gerais, 1995.

WFOX <sub>2</sub>	EIE		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	24	7	31
Negativo	24	75	99
Total	48	82	130

$$\text{Sensibilidade} = \frac{24}{48} \times 100 = 50\%$$

$$\text{Especificidade} = \frac{75}{82} \times 100 = 91\%$$

Tabela 7 - Sensibilidade e especificidade do teste de WF OX<sub>19</sub>, em relação ao EIE, Minas Gerais, 1995.

WFOX <sub>19</sub>	EIE		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	26	8	34
Negativo	22	74	96
Total	48	82	130

$$\text{Sensibilidade} = \frac{26}{48} \times 100 = 54\%$$

$$\text{Especificidade} = \frac{74}{82} \times 100 = 90\%$$

Tabela 8 - Sensibilidade e especificidade do teste de WF OX<sub>2</sub>, em relação a RIFI, Minas Gerais, 1995.

OX <sub>2</sub>	RIFI		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	31	36	67
Negativo	23	581	604
Total	54	617	671

$$\text{Sensibilidade} = \frac{31}{54} \times 100 = 57\%$$

$$\text{Especificidade} = \frac{581}{617} \times 100 = 94\%$$

Tabela 9 - Sensibilidade e especificidade do teste de WF OX<sub>19</sub>, em relação a RIFI, Minas Gerais, 1995.

OX <sub>19</sub>	RIFI		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	32	91	123
Negativo	22	526	548
Total	54	617	671

$$\text{Sensibilidade} = \frac{32}{54} \times 100 = 59\%$$

$$\text{Especificidade} = \frac{526}{617} \times 100 = 85\%$$

Tabela 10 - Título de 12 amostras de soros humanos nas técnicas de RIFI e WF OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub> realizados para diagnóstico de FM em Minas Gerais, 1995.

SORO N°.	OX <sub>2</sub>	OX <sub>19</sub>	RIFI
578	80	320	512
606	40	80	256
636	80	40	512
644	80	160	512
787	320	40	64
795	160	40	512
671	80	160	64
695	80	160	256
27	Neg	80	64
254	80	320	128
412	40	Neg	256
419	40	40	64

Tabela 11 - Distribuição de exames realizados por RIFI com *Rickettsia rickettsii*, enviados pelas DRS e SUS-MG no período de julho/93 a novembro/95.

DRS	EXAMES				Total
	Negativo	%	Positivo ≥ 1 : 64	%	
Belo Horizonte	283	95,3	14	4,7	297
Governador Valadares	262	94,9	14	5,1	276
Divinópolis	60	93,7	04	6,3	64
Teófilo Otoni	51	76,1	16	23,9	67
Coronel Fabriciano	45	90,0	05	10,0	50
Diamantina	14	82,4	03	17,6	17
Itabira	14	93,3	01	6,7	15
Patos de Minas	07	100,0	0	0	07
Juiz de Fora	04	66,7	02	33,7	06
Manhumirim	05	100,0	0	0	05
Montes Claros	01	100,0	0	0	01
Ponte Nova	01	100,0	0	0	01
Uberlândia	01	100,0	0	0	01
Alfenas	01	100,0	0	0	01
Total	749	92,7	59	7,3	808

Fonte: Livro de Registros da DBM/IOM/FUNED

Gráfico 1 - Soros humanos testados pelas técnicas EIE e teste de WF com antígenos de *Proteus* OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub> para diagnóstico de FM em Minas Gerais, 1995.

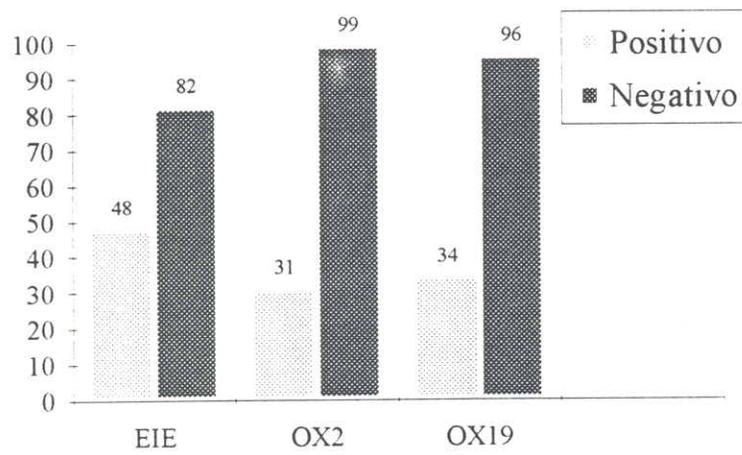


Gráfico 2 - Comparações de resultados entre EIE com a RIFI, e teste de WF, OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub> realizado em soros humanos para diagnóstico de FM em Minas Gerais, 1995.

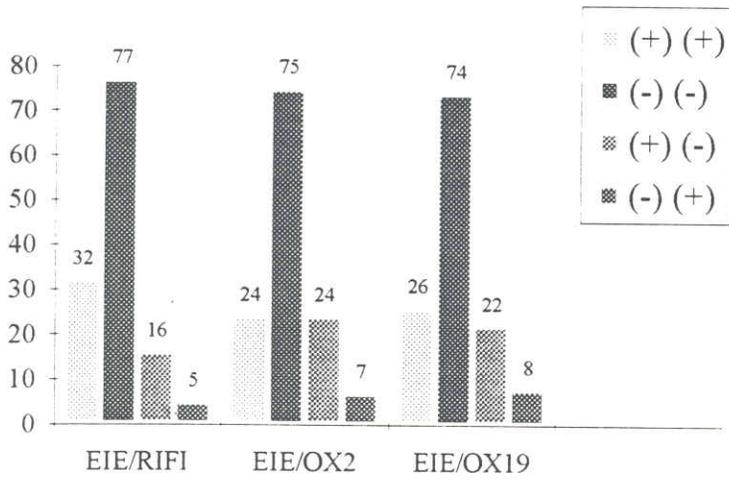


Gráfico 3 - Comparações de resultados entre a RIFI, e os testes EIE e WF, OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub> realizado em soros humanos para diagnóstico de FM em Minas Gerais, 1995.

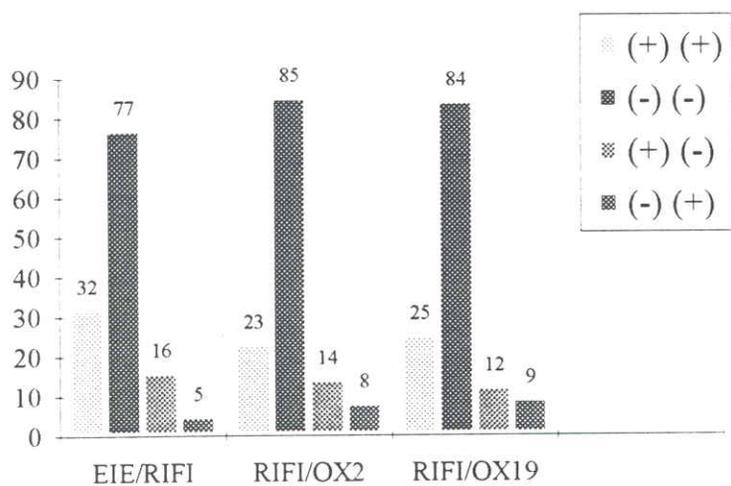


Gráfico 4 - Resultado dos testes de RIFI e WF, OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub> em soros humanos enviados para diagnóstico de FM em Minas Gerais, 1995.

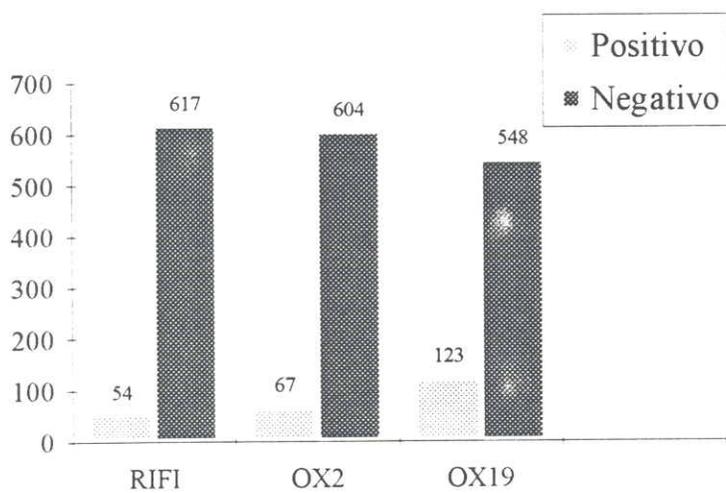
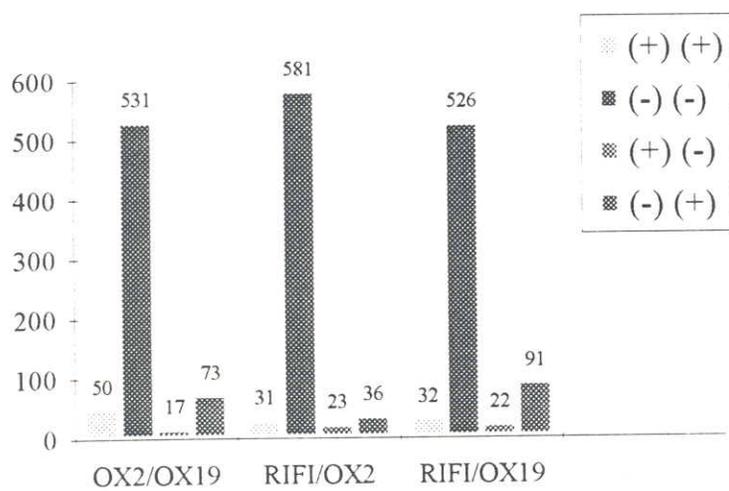


Gráfico 5 - Resultados comparativos entre os testes de RIFI e WF OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub> realizados em soros humanos para diagnóstico de FM em Minas Gerais, 1995.



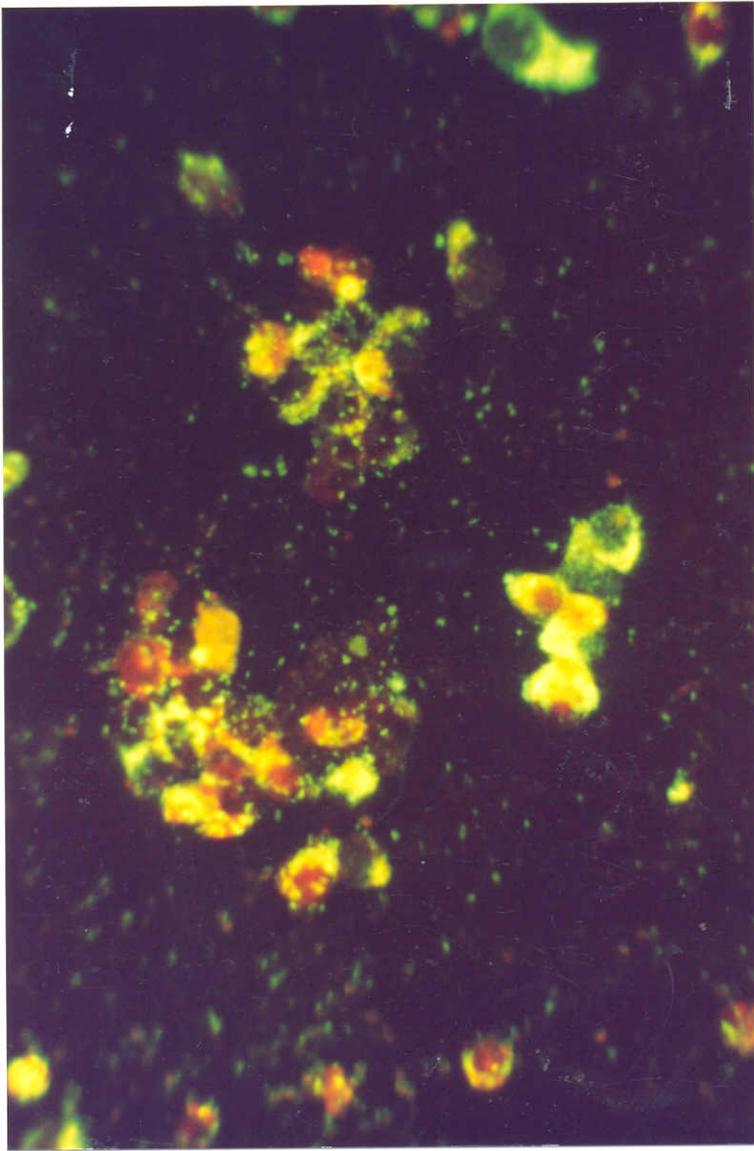


Figura 1 Reação de imunofluorescência indireta para *Rickettsia rickettsii*, reação positiva, aumento de 40x.

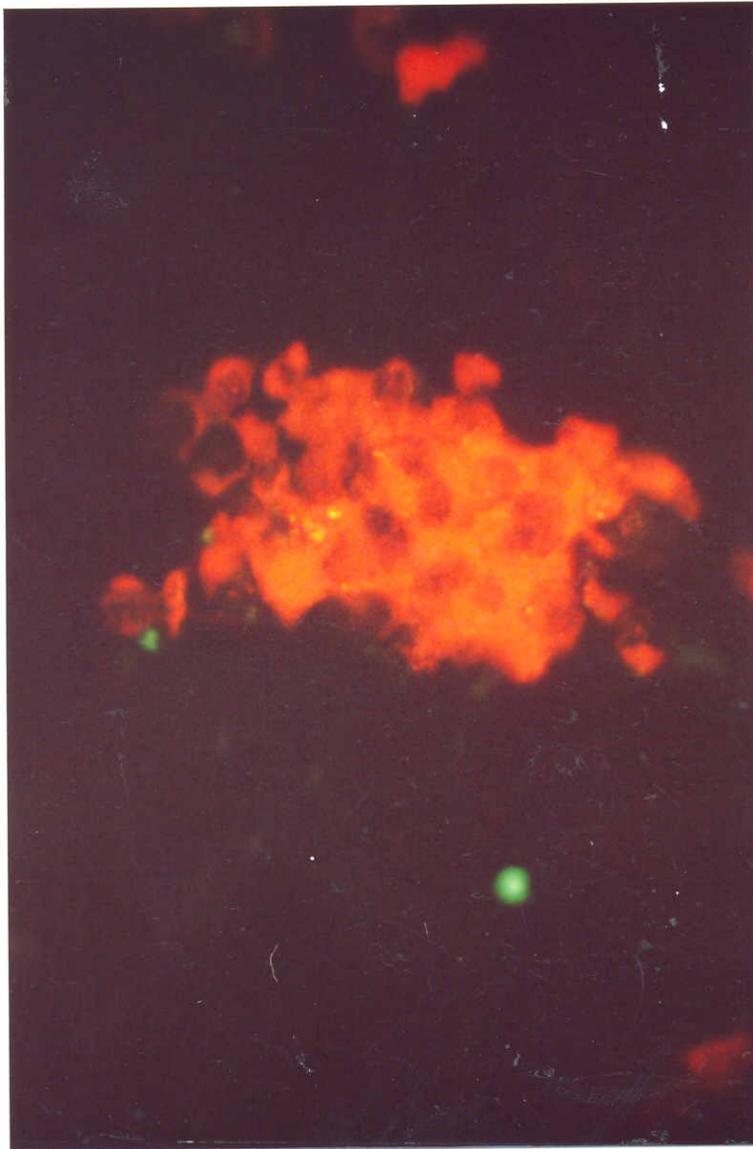


Figura 2 Reação de imunofluorescência indireta para *Rickettsia rickettsii* reação negativa, aumento de 40x.

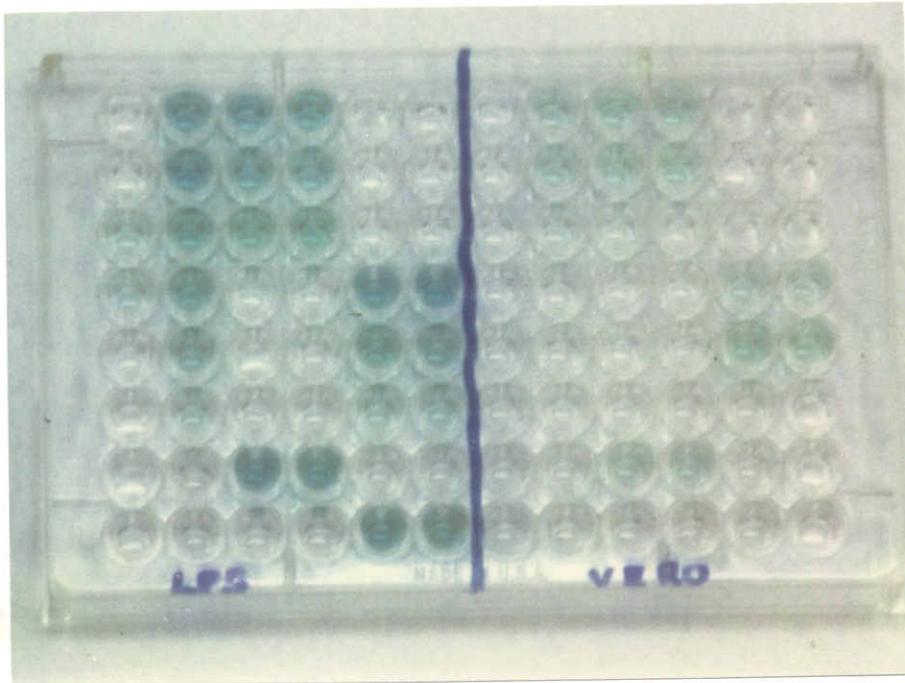


Figura 3 Reação imunoenzimática direta, coloração esverdeada positivo; coloração transparente -negativo.

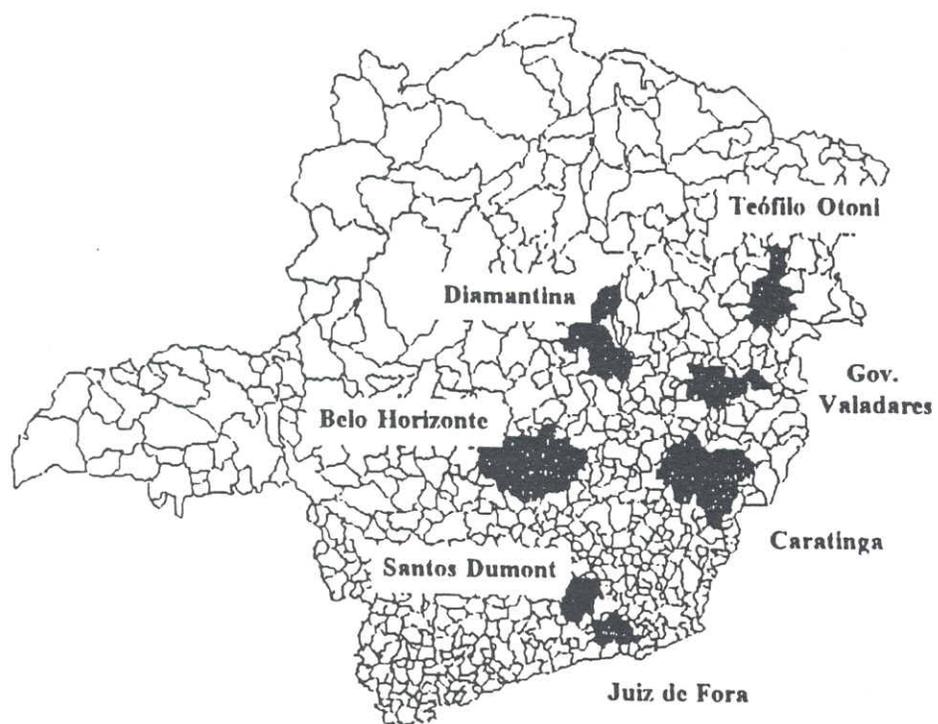


Figura 4 Mapa de distribuição das localidades onde apareceram casos de FM no estado de Minas Gerais;  
Fonte: FUNED-MG

## 5. CONCLUSÕES

O teste de Weil Felix antígenos *Proteus* OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub>, pode ser utilizado como teste de triagem para FM.

O teste de WF antígeno *Proteus* OX<sub>2</sub> é ligeiramente mais específico que o OX<sub>19</sub>.

O teste de WF antígeno *Proteus* OX<sub>19</sub> é ligeiramente mais sensível que o OX<sub>2</sub>.

A maior sensibilidade do teste OX<sub>19</sub> e maior especificidade do OX<sub>2</sub> sugerem que os testes sejam feitos concomitantemente.

Títulos iguais a 80 não devem ser descartados quando o teste de WF é utilizado como método de triagem em FM.

As sensibilidades e especificidades do teste de WF OX<sub>2</sub> e OX<sub>19</sub> deram resultados semelhantes, quando comparadas tanto pela RIFI, como pelo EIE.

## 6. SUMMARY

Key words: Rocky Mountain Spotted Fever, *Rickettsia rickettsii*, *Amblyomma cajennense*

671 samples of human serum were received by Fundação Ezequiel Dias (FUNED) from August 1993 to October 1995 provided from cities of Minas Gerais State, Brazil, with clinical suspected of Rocky Mountain Spotted Fever (FM) occurrence. Sera were assayed by Weil Felix (WF) agglutination test for FM screening and the results were compared to indirect immunofluorescence (IFA) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Results obtained showed high levels of specificity from 85% to 96% and relative sensibility from 50% to 59%. Statistical analyses revealed chi square highest than critical value (10,38)  $p < 0,001$  demonstrating an association among the tests when compared WF, IFA and ELISA. Results suggested that WF test is useful to screening FM.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COMER, K.M. Rocky Mountain Spotted Fever. Veterinary Clinics of North America : Small Animal Practice , v.21, n.1, p.27-42, 1991.

D'ANGELO, J.L. ; BREGMAN, J.D.; WINKLER, G.W. Rocky Mountain Spotted Fever in United States : Use of Age-Specific incidence to determine Public Health Police for a vector-borne disease. Southern medical Journal , v.75, n.1, January 1982.

DIVISION OF VIRAL AND RICKETTSIAL DISEASES. Indirect fluorescent antibody technique for the detection of rickettsial antibodies. National Center for Infection Diseases, CDC, Atlanta,USA. s.d. 11p (mimeografado).

FISHBEIN, D.B. Rickettsial infections. Textbook of Intern Med , New York, Kelly Willian N. , c.298, p.1462-1466, 1992.

GALVÃO, M.A.M. ; RIBEIRO, J.G.L. A Febre Maculosa.In: PEDROSO, E.R.P.; ROCHA, M.O.G. ; SILVA, O.A. Clínica Médica ; Os princípios da prática ambulatorial, São Paulo, Atheneu, p.1374-1380, 1993.

GALVÃO, M.A.M. A febre maculosa brasileira em Minas Gerais e seus determinantes , Rio de janeiro : Escola Nacional de Saúde Pública, 1988. Dissertação (mestre em Saúde Pública) Rio de Janeiro,1988.

- HOSKINS, J.D. Rocky mountain spotted fever. Seminars Veterinary Medicine - surgery - small animal , v.6, n.3, p.240-241, 1991.
- JONES, D. ; ANDERSON, B. ; OLSON, J. ; GREENE, C. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of human immunoglobulin G to lipopolysaccharide of spotted fever group rickettsiae. Journal of Clinical Microbiology , v.31, n.1, p.138-141, 1993.
- KAPLAN, J.E. ; SCHONBERGER, L.B. The sensitivity of various serologic tests in the diagnosis of rocky mountain spotted fever. American Journal. Tropical. Medicine. Hygiene , v.35, n.4, p.840-844, 1986.
- MAGALHÃES, O. Contribuição ao conhecimento das doenças do grupo tifo exantemático. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1952.
- McDADE, J. ; NEWHOUSE, F.V. Natural history of Rickettsia Rickettsii , Ann. Rev. Microbiol. , v.40, p.287-309, 1986.
- MANCINI, D.A.P. ; NASCIMENTO, E.M.M. ; TAVARES, V.R. et al. A ocorrência de riquetsioses do grupo Rickettsia Rickettsii . Rev. Saúde Pública , v.17, p.493-499, 1983.
- OSTER, C.N.; BURKE, D.S., KENYON, R.H. et al. Laboratory acquired rocky mountain spotted fever, New England Journal. Medicine. , v.297, n.16, p.859-862, 1977.
- PELCZAR, M., REID, R., CHAN, E.C.S. Microbiologia, São Paulo, ed. Mc Graw, v.1, c.14, p.295-307, 1981.

- PHILIP, R.N. ; CASPER , E.A. ; MAC CORMACK, J.N. et al. A comparison of serologic methods for diagnosis of rocky mountain spotted fever. American Journal of Epidemiology , v.105, n.1, p.56-66, 1977.
- PLANK, S.J. ; TEIXEIRA, R.S. ; MILANESI, M.L. Febre Maculosa em Salvador: descrição de um caso. Revista Médica Bahia, v.25, n.1, p.330-334, 1979.
- U.S.DEPARTAMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES.  
Rocky mountain spotted fever, NIH Publication , n.85-400, September 1985.
- U.S.DEPARTAMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES.  
Ticks of public health importance and their control, HHS Publication , n. 800-8142, 1978.
- WALKER, D.H. ; BURDAY,M.S.; FOLOS, J.D. et al. Laboratory diagnosis of rocky mountain spotted fever, Southern Medical Journal , v.73, p.1443-1446, 1980.
- WALKER, D.H. ; PEACOCK, M.G. Laboratory diagnosis of Rickettsial diseases, Biology of Rickettsial Diseases , v.II, CRC Press, Boca Raton, Flórida, 1988.
- WEIL, E. ; FELIX, A. Zur serologischen diagnose das fleckfiebers, Wien. Klin. Wochenschr. , v.29, p.974, 1916.
- WHITE, D.J. ; FLYNN, M.K. Rocky mountain spotted fever in New York State, Annals of the New York Academy of Science , v.590, june 26, New York, 1990.