

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ)**

**Mestrado em Medicina Tropical**

**Estudo da febre Q em seres humanos, animais domésticos e artrópodes em uma área no  
Município de Itaboraí, Rio de Janeiro.**

**Maria Angélica Monteiro de Mello Mares-Guia**

**RIO DE JANEIRO**

**2011**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ)**

**Mestrado em Medicina Tropical**

**Estudo da febre Q em seres humanos, animais domésticos e artrópodes em uma área no  
Município de Itaboraí, Rio de Janeiro.**

**Maria Angélica Monteiro de Mello Mares-Guia**

**Dissertação apresentada ao Instituto  
Oswaldo Cruz como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Mestre em  
Medicina Tropical, área de concentração:  
Diagnóstico, epidemiologia e controle de  
doenças infecciosas e parasitárias.**

**ORIENTADORA: Dra. Elba Regina Sampaio de Lemos**

**RIO DE JANEIRO**

**2011**

**ii**

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

M325

Mares-Guia, Maria Angélica Monteiro de Mello.

Estudo da febre Q em seres humanos, animais domésticos e artrópodes em uma área no Município de Itaboraí, Rio de Janeiro. / Maria Angélica Monteiro de Mello Mares-Guia. – Rio de Janeiro, 2011.  
xv, 68f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2011.

Bibliografia: f. 54-59

1. *Coxiella burnetii*. 2. *C. burnetii*. 3. Febre Q. 4. PCR. 5. Diagnóstico sorológico. 6. Diagnóstico molecular. I. Título.

CDD 616.92

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ)**

**Mestrado em Medicina Tropical**

**Estudo da febre Q em seres humanos, animais domésticos e artrópodes em uma área no  
Município de Itaboraí, Rio de Janeiro.**

**Maria Angélica Monteiro de Mello Mares-Guia**

**ORIENTADORA: Dra. Elba Regina Sampaio de Lemos**

Aprovada em: 15 de dezembro de 2011

**EXAMINADORES:**

Dr. José Rodrigues Coura – (Presidente e Revisor) – IOC/FIOCRUZ

Dr. Ernesto Hofer – IOC/FIOCRUZ

Dr. Sérgio Setúbal – UFF/RJ

Dra. Márcia dos Santos Lazéra – (Suplente) – IPEC/FIOCRUZ

Dr. Paulo Vieira Damasco – (Suplente) – UERJ

**RIO DE JANEIRO**

**2011**

iv

*Ninguém pode saber o que está para acontecer:  
está acontecendo, cada vez, pela primeira vez, pela única vez.*

*James Baldwin*

*O importante é não parar de questionar.  
A curiosidade tem sua própria razão de existir.*

*Albert Einstein*

## AGRADECIMENTOS

À minha família, templo sagrado das minhas diversas formas de ser. Pelo acolhimento, luta, crença e amor divididos nesta trajetória pelo simples e puro conhecimento que é o compartilhar. Meus melhores amigos se encontram ali, me esperando sempre depois das batalhas para curarem minhas feridas e me lembrarem do sentido da vida.

À minha orientadora, Dra. Elba Regina Sampaio de Lemos, que começou com um delicado convite para me apresentar a este universo da pesquisa, depois lentamente me desafiou a experimentar e também praticar, me ensinou e principalmente acreditou na minha capacidade. Com seu exemplo e dedicação me impulsionou até este momento, me orientando em todos os níveis para realizar um trabalho que ambas pudéssemos nos orgulhar. Obrigada por ter aceitado o desafio de me orientar nesta dissertação de mestrado em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz.

Aos colegas e amigos, profissionais do Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses, que além da capacitação técnica que recebi, foram a campo e na bancada juntos como uma equipe possibilitando a realização de várias etapas deste trabalho. Aprendi muitas coisas e uma delas é que ninguém realiza nada de valor sozinho. Adoraria descrever cada um e sua qualidade especial, até daqueles que não se encontram mais conosco, mas teria que escrever outra dissertação somente para isso. Muito obrigada por terem estado ao meu lado.

Aos profissionais do CECAL pela disponibilidade e auxílio na coleta de amostras para usar como controles para procedimentos técnicos.

À Dra. Eliane Veiga da Costa, do Laboratório de Enterovírus/IOC, pela sua delicadeza e disponibilidade para melhorar a metodologia nos processos de extração para análise molecular.

Aos profissionais do Laboratório de Vírus Respiratório e do Sarampo do Instituto Oswaldo Cruz, pela disponibilização de equipamentos para sequenciamento e outras técnicas.

Ao Dr. Paulo Vieira Damasco por sua colaboração e participação neste trabalho.

À Secretaria Municipal de Saúde de Itaboraí, em especial a Andrea L. Santana.

Ao paciente e seus familiares pela disponibilidade e dedicação na colaboração para realização deste trabalho.

À Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, pela formação e a possibilidade de vislumbrar a importância do papel de um profissional tropicalista através de tantos exemplos inesquecíveis que perdurarão na minha memória. Espero fazer justiça a esses exímios profissionais que pude conhecer nesta casa.

AGRADECIMENTO À EQUIPE



## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES E SÍMBOLOS	Pág.
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1- INTRODUÇÃO .....	1
2- REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1- Histórico .....	4
2.2- Caracterização do Agente Etiológico .....	5
2.2.1- Classificação do Agente Etiológico .....	5
2.2.2- Variações Antigênicas .....	7
2.2.3- Ciclo de Vida Intracelular .....	8
2.2.4- Imunidade <i>versus</i> Mecanismos de Sobrevivência da Bactéria .....	10
2.2.5- Mecanismos de Eliminação da Bactéria .....	13
2.3- Patogenia .....	14
2.4- Epidemiologia.....	14
2.4.1- Vias de exposição .....	14
2.4.2- Ciclo de vida e manutenção na natureza.....	15
2.4.3- Reservatórios .....	16
2.4.4- Situação Mundial .....	17
2.5- Diagnóstico Laboratorial .....	19
2.5.1- Diagnóstico Sorológico.....	19
2.5.2- Diagnóstico Molecular.....	20
2.5.3- Isolamento Bacteriano .....	21
2.5.4- Histopatologia Associada com Imunohistoquímica .....	22
2.6- Infecção .....	22
2.6.1- Infecção em Humanos .....	23
2.6.1.1- Febre Q Aguda .....	24
2.6.1.2- Febre Q Crônica .....	24
2.6.2- Infecção em Animais .....	25
2.7- Profilaxia e Medidas de Prevenção .....	25
3- JUSTIFICATIVA.....	27
4- OBJETIVOS .....	28
4.1- Objetivo Geral .....	28
4.2- Objetivos Específicos .....	28



5 - MATERIAL E MÉTODOS .....	29
5.1- Desenho do Estudo .....	29
5.2- Considerações Éticas .....	29
5.3- Estudo da Área e Divisão de Etapas .....	29
5.4- Detalhamento da Coleta de Amostras .....	30
5.4.1- Etapas de Trabalho de Campo .....	30
5.5- Metodologia Laboratorial .....	34
5.5.1- Teste Sorológico .....	34
5.5.2- Análise molecular .....	35
5.5.2.1- Extração de DNA .....	35
5.5.2.2- Procedimento de PCR Convencional .....	36
5.5.2.3- Procedimento de sequenciamento e análise filogenética.....	36
5.5.2.4- Procedimento de PCR Nested .....	37
5.5.3 Análise dos artrópodes .....	38
6- RESULTADOS .....	39
7- DISCUSSÃO.....	48
8- CONCLUSÕES.....	52
9- PERSPECTIVAS .....	53
10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	54
11- ANEXOS	
Anexo 1: Trabalhos Científicos Resultantes desta Dissertação .....	60
Anexo 2: Folha de Rosto do CEP para o Projeto .....	61
Anexo 3: Termo de Compromisso da SMS de Itaboraí .....	62
Anexo 4: Artigo Publicado no Vector-Borne and Zoonotic Diseases .....	63
Anexo 5: Resumo Publicado no Tropical Medicine & International Health.....	66
Anexo 6: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para coleta de animais .....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES E SÍMBOLOS

CDC	Center for Diseases Control (Centro de Controle de Doenças)
<i>C. burnetii</i>	<i>Coxiella burnetii</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Ensaio imunoenzimático)
EPI	Equipamento de proteção individual
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
fL	Fentolitros
g%	Gramas por cento
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HEPA	Filtros de partículas aéreas de alta eficiência
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
LCV	Variante de grandes células
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mL	Mililitro
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
%	Percentual
pg	Picograma
pH	Concentração hidrogeniônica
rpm	Rotação por minuto
SCV	Variante de pequenas células

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS	Pág.
Figura 2.1: Detalhe de imagem em micrografia eletrônica de seções finas de células <i>Coxiella burnetii</i> , dois LCVs (variante de grandes células) de endósporos (E) (setas). Barra, 0,4 µm (McCaul & Williams 1981). .....	6
Figura 2.2: Árvore filogenética mostrando as relações de <i>C. burnetii</i> com outras espécies pertencentes à Proteobacterias. A árvore foi construída pelo método de agrupamento de semelhantes com sequências de genes 16S rRNA (Maurin & Raoult 1999) .....	7
Figura 2.3: Esquema do ciclo de desenvolvimento de <i>C. burnetii</i> no fagolisossomo das células eucarióticas (McCaul & Williams 1981) .....	10
Figura 2.4: Células L929 infectadas com <i>C. burnetii</i> fase I em telófase com uma célula filha emergente infectada (seta) e uma célula filha livre de parasita. Ao lado uma célula normal não infectada. A fotomicrografia foi feita de células continuamente infectadas por 465 dias. Barra, 5 µm. (modificado de Roman et al. 1986). .....	13
Figura 2.5: Figura esquemática ilustrando a inter-relação entre os ciclos da perpetuação da infecção na natureza entre animais domésticos e animais silvestres .....	16
Figura 2.6: Cinética de anticorpos e técnicas de diagnóstico da febre Q aguda (Raoult & Parola 2007). .....	20
Figura 2.7: História natural da febre Q humana na ausência de tratamento (Angelakis & Raoult 2010). .....	23
Figura 5.1: Município de Itaboraí na região metropolitana do estado do Rio de Janeiro local onde surgiu o foco da infecção. ....	30
Figura 5.2: Febre Q no Município de Itaboraí, Rio de Janeiro. Propriedade do paciente, no local onde foi indentificado o foco da infecção .....	31
Figura 5.3: Febre Q no Município de Itaboraí, Rio de Janeiro. Coleta de material de animais na propriedade do paciente, no local onde foi indentificado o foco da infecção. ....	31
Figura 5.4: Febre Q no Município de Itaboraí, Rio de Janeiro. Local da segunda etapa, realizada na residência para onde foi vendido o lote de cabras no município de Itaboraí. ....	32

Figura 5.5: Febre Q no Município de Itaboraí, Rio de Janeiro. Método de coleta de material de animais, com a utilização de equipamentos de proteção individual para filtragem de ar com filtros HEPA.....	33
Figura 5.6: Figura esquemática da lâmina para teste de imunofluorescência indireta para febre Q com dois microcículos dentro do poço contendo antígenos da fase II (microcículo do lado esquerdo) e da fase I (microcículo do lado direito) na visualização do microscópio. ....	34
Figura 6.1: Eletroforese em gel de agarose de <i>Coxiella burnetii</i> , produto da reação em cadeia da polimerase amplificado a partir de DNA total de amostras individuais de leite de caprinos na propriedade que mantinha as cabras que foram vendidas pelo caso índice de febre Q, no Município de Itaboraí, RJ.....	43
Figura 6.2: Eletroforese em gel de agarose de <i>Coxiella burnetii</i> , produto da reação em cadeia da polimerase amplificado para purificação a partir de DNA total de amostras de soro de cães da residência do caso confirmado de febre Q no Município de Itaboraí, RJ e de uma amostra de leite que apresentou banda fraca. ....	44
Figura 6.3: Figura parcial da análise da sequência de PCR-amplificado do DNA genômico de amostra de leite de cabra por BioEdit - cromatograma, com 99% de identidade com a sequência homóloga do gene transposon <i>C. burnetii</i> depositado no GenBank .....	44
Figura 6.4: Eletroforese em gel de agarose de <i>C. burnetii</i> , produto da reação em cadeia da polimerase Nested amplificado a partir de produto da PCR de DNA total de amostras individuais de leite de caprinos na propriedade que mantinha as cabras que foram vendidas pelo caso índice de febre Q, no Município de Itaboraí, RJ .....	45
Figura 6.5: Árvore filogenética baseada nas sequências nucleotídicas obtidas no estudo e nas disponíveis no GenBank ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a> ) a partir do gene alvo <i>htpAB</i> de <i>Coxiella burnetii</i> . A árvore filogenética foi construída usando software Mega 5 método “neighbor-joining”. Análise “bootstrap” foi feita com 1000 replicatas .....	47

## TABELAS E QUADROS

Tabela 2.1: Tipos de células em sistemas de cultura ( <i>in vitro</i> ) que permitem crescimento de <i>C. burnetii</i> e seus respectivos hospedeiros. ....	8
Tabela 2.2: Alguns genes e “primers” derivados disponíveis para amplificação por PCR de <i>C. burnetii</i> (Fournier et al. 1998). ....	21
Quadro 5.1: Oligonucleotídeos (“primers”) utilizados para detecção de <i>Coxiella burnetii</i> .....	35
Quadro 5.2: Oligonucleotídeos (“primers” internos) utilizados para detecção de <i>Coxiella burnetii</i> na segunda reação de PCR.....	37
Tabela 6.1: Análise sorológica e molecular em amostras de sangue coletadas de caso suspeito de febre Q e de familiares no Município de Itaboraí, RJ.....	39
Tabela 6.2: Análise sorológica e molecular em amostras de sangue coletadas de animais da residência do caso confirmado de febre Q no Município de Itaboraí, RJ.....	39
Tabela 6.3: Identificação taxonômica e análise molecular de artrópodes coletados de animais da residência do caso confirmado de febre Q no Município de Itaboraí, RJ.....	40
Tabela 6.4: Análise sorológica e molecular em amostras de sangue coletadas de moradores da propriedade que mantinha as cabras que foram vendidas pelo caso índice de febre Q, no Município de Itaboraí, RJ. ....	40
Tabela 6.5: Análise sorológica e molecular em amostras de sangue coletadas de animais da propriedade que mantinha as cabras que foram vendidas pelo caso índice de febre Q, no Município de Itaboraí, RJ .....	41
Tabela 6.6: Identificação taxonômica e análise molecular em amostras dos artrópodes coletados de animais da propriedade que mantinha as cabras que foram vendidas pelo caso índice de febre Q, no Município de Itaboraí, R.....	42
Tabela 6.7: Análise molecular das amostras de fezes coletadas de caprinos na propriedade que mantinha as cabras que foram vendidas pelo caso índice de febre Q, no Município de Itaboraí, RJ .....	42

## RESUMO

Febre Q é uma zoonose cosmopolita causada por *Coxiella burnetii*, pequena bactéria intracelular obrigatória gram-negativa e pleomórfica da ordem Legionellales. A doença, que ocorre como pequenos surtos ou como casos isolados, tem amplo espectro de manifestações clínicas, desde uma doença febril limitada, pneumonia, hepatite a endocardite e meningoencefalite. Carrapatos, animais de fazenda, domésticos e selvagens são reservatórios da infecção. A transmissão para o homem ocorre por inalação de aerossóis provenientes de urina, fezes, leite e produtos de abortamento ou menos comumente pela ingestão de leite cru de animais infectados.

No Brasil, desde a primeira descrição de febre Q em 1953, em São Paulo, todos os casos têm sido identificados com base em teste sorológico e os poucos estudos soroepidemiológicos em população de risco apontam para a circulação de *C. burnetii*.

Em 2008 foi possível confirmar um caso de febre Q em um paciente, a partir de análise sorológica e molecular.

Com o objetivo de rastrear um foco de infecção por *C. burnetii*, um estudo epidemiológico descritivo foi desenvolvido na área de ocorrência do primeiro caso no Brasil de febre Q confirmado, em 2008, por análise molecular, no Município de Itaboraí, Rio de Janeiro. Análises sorológicas e moleculares foram realizadas em amostras biológicas de familiares e de cães, gatos, cabras e equinos existentes na área estudada, em 2009.

Amostras de soro foram submetidas ao teste comercial de imunofluorescência indireta (PANBIO<sup>TM</sup>), título de corte de 64, para a pesquisa de anticorpo anti-*C. burnetii*, fases I e II. Amostras de sangue dos familiares e dos animais, assim como de leite, fezes e de secreção nasal, vaginal, além dos artrópodes, coletados nos animais, foram submetidas à PCR (reação em cadeia da polimerase) para a presença da bactéria, utilizando oligonucleotídeos para o gene alvo *htpAB*. Reatividade foi identificada em amostras de soro da esposa, de 2 dos 13 caninos, 05 de 10 caprinos e 02 das 03 ovinos. O genoma foi recuperado em amostra de sangue e/ou leite ou swab anal de 02 cães e 06 cabras. O sequenciamento dos produtos de PCR amplificados, do soro dos cães e do leite das cabras, mostraram identidade de 99% para as sequências depositadas no GenBank.

Embora não seja uma doença de notificação, os dados obtidos confirmam a circulação deste agente zoonótico e servem de alerta para a necessidade de vigilância epidemiológica da febre Q, em especial em Itaboraí, devido, entre outros fatores, ao crescente desmatamento com ocupação de vastas áreas e da criação, informal e de caráter familiar, de cabras leiteiras por pequenos proprietários nas diversas áreas do território nacional.

## ABSTRACT

Q fever is a zoonosis caused by *Coxiella burnetii*, a obligate intracellular and pleomorphic, small gram-negative bacterium of Legionellales order. The disease, which can occur as small outbreaks or isolated cases, has a broad spectrum of clinical manifestations, from a limited febrile illness, pneumonia, hepatitis, endocarditis, and meningoencephalitis. Ticks, farm animals, domestic and wild are reservoirs of infection. Transmission to humans occurs through inhalation of aerosols from urine, feces, milk and products of abortion or less commonly by ingestion of raw milk from infected animals.

In Brazil, since the first description of Q fever in 1953, in Sao Paulo, cases have been identified by serological tests and very few seroepidemiological studies in the population at risk have been performed showing the circulation of *C. burnetii*.

In 2008 it was possible to confirm a case of Q fever in a patient, from molecular and serological analysis.

Aiming to track the source of infection for *C. burnetii*, a descriptive epidemiologic study was developed in the area of occurrence of the first case of Q fever in Brazil in 2008, confirmed by molecular analysis in Itaboraí, Rio de Janeiro. Serological and molecular analysis was performed on biological samples from family and dogs, cats, goats and horses in the area of studied in 2009.

Serum samples were tested with commercial indirect immunofluorescence (PANBIO™), a cutoff of 64, for the detection of anti-*C. burnetii*, phases I and II. Blood samples from family members and animals, like milk, feces and nasal discharge, vaginal, and arthropods collected in animals were subjected to PCR (polymerase chain reaction) for the presence of bacteria, using primers for *htpAB* the target gene. Reactivity was detected in serum samples from his wife, two of the 13 dogs, 05 of 10 goats and 02 of 03 sheeps. The genome was recovered in a sample of blood and / or milk or anal swabs from 02 dogs and 06 goats. The sequencing of the PCR products amplified from the serum of dogs and goats' milk, showed 99% identity to the sequences deposited in GenBank

Although not a notifiable disease, our data confirm the circulation of this zoonotic agent and serve as a reminder of the need for surveillance of Q fever, especially in Itaboraí due, among other factors, the increasing deforestation and occupation of vast areas and the creation of informal and familiar character in dairy goats by smallholders in various areas of the country.

## 1- INTRODUÇÃO

Febre Q é uma zoonose cosmopolita causada por *Rickettsia burnetii* (Derrick 1939), posteriormente renomeada como *Coxiella burnetii* Philip. 1948, uma pequena bactéria intracelular obrigatória gram-negativa e pleomórfica da ordem Legionellales. *Coxiella burnetii* existe em duas fases antigênicas, chamadas fase I e fase II. Na natureza, *C. burnetii* expressa apenas a fase I do antígeno que é observada em humanos infectados, animais e artrópodes e representa a forma infecciosa da bactéria. A variante fase II é obtida após várias passagens em ovos embrionados ou culturas celulares e é menos virulenta. A reversão para fase I é possível pela inoculação no hospedeiro animal. (Fournier et al. 1998). A resistência anormalmente elevada contra fatores químicos e físicos é um dos atributos mais impressionantes de *C. burnetii*. Ela permite a este organismo persistir no ambiente por tempo prolongado e permanecer infeccioso. A capacidade de esporulação deste microorganismo, sua resistência ao calor, à dissecação e a muitos desinfetantes justificam a sua alta infectividade, fato que torna esta proteobactéria uma possível arma de bioterrorismo classificada como agente de categoria B. Estudos mostram que apenas um único organismo inalado pode produzir doença clínica (Raoult & Marrie 1995, Raoult et al. 1993).

Bovinos, ovinos e caprinos são os reservatórios primários de *C. burnetii*. A infecção é conhecida em uma grande variedade de outros animais, incluindo outras espécies de ruminantes, animais domésticos e também animais selvagens (Maurin & Raoult 1999, CDC 2011). Os reservatórios de *C. burnetii* incluem mamíferos, aves e artrópodes, principalmente os carrapatos (Fenollar et al. 2004). *Coxiella burnetii* normalmente não causa manifestação clínica nestes animais, embora abortos em cabras e ovelhas possam estar relacionados com infecção por este microorganismo que é excretado no leite, urina e fezes dos animais infectados. Durante o momento do nascimento dos animais, *C. burnetii* está presente em grande quantidade nos fluídos amnióticos e na placenta. A transmissão para os seres humanos dá-se geralmente através da inalação de aerossóis contaminados provenientes da urina, fezes, leite, líquido amniótico, placenta, produtos de abortamento, lã ou menos comumente pela ingestão de leite cru de animais infectados (CDC 2011). Este amplo espectro de reservatórios e a resistência única de *C. burnetii* a fatores ambientais tornam, conforme mencionado previamente, o rastreamento da fonte de infecção muito difícil (Raoult & Parola 2007).

Roedores silvestres de pequeno porte são importante reservatório de *C. burnetii* e a infecção humana está principalmente relacionada a animais de fazenda como ovelhas, carneiros e gado bovino, mas nos surtos urbanos estão implicados principalmente os gatos,



cães e coelhos. Carrapatos transmitem *C. burnetii* a animais, mas não ao homem (Raoult & Marrie 1995).

A infecção por *C. burnetii* é frequentemente adquirida pela exposição a animais e, embora seja considerada de distribuição mundial, não existem dados sobre esta zoonose no Brasil, por não ser uma doença de notificação obrigatória, exceto algumas escassas informações sobre a evidência sorológica em humanos e animais nos estados da Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (Borges 1962, Brandão et al. 1953, Costa et al. 2004, 2006, Lamas et al. 2009, Ribeiro-Valle et al. 1955, Ribeiro-Neto et al. 1964, Riemann et al. 1974, 1975, Siciliano et al. 2006, 2007, 2008, Travassos et al. 1954).

A febre Q é uma doença com amplo espectro de manifestações clínicas, que vão desde uma doença febril limitada, pneumonia, hepatite e outras formas de risco, tais como endocardite e meningoencefalite (Cunha et al. 2009, Tissot-Dupont & Raoul 2008). A febre Q aguda é assintomática em 60% de pessoas infectadas. Nos pacientes sintomáticos, a apresentação clínica é inespecífica e polimórfica. Doença febril limitada, pneumonia atípica e hepatite são as formas mais comuns na febre Q aguda descrita até o momento. A febre Q aguda é usualmente oligossintomática, mas pacientes com anormalidades cardiovasculares apresentam risco maior de desenvolver a infecção crônica. Alguns pacientes, ocasionalmente, evoluem para a forma crônica da doença e a endocardite subaguda pode surgir meses ou anos mais tarde, com comprometimento principalmente da valva aórtica. Hepatite granulomatosa com um curso mais prolongado pode ser observado em alguns pacientes e o diagnóstico somente é possível mediante biópsias hepáticas. O comprometimento renal com glomerulonefrite também tem sido descrito na febre Q (Olson & Mcdade 1994, Brouqui et al. 2003, Raoult & Parola 2007).

Quanto ao diagnóstico laboratorial, a febre Q pode ser detectada por técnicas sorológicas, moleculares, além de isolamento e de histopatologia associada com imunohistoquímica. Nos casos de febre Q aguda, os níveis de anticorpos de fase II estão normalmente mais altos que os de fase I, muitas vezes por várias ordens de magnitude, e, geralmente, são primeiro detectados durante a segunda semana de doença. Na fase crônica a situação se reverte, anticorpos de fase I para antígenos de *C. burnetii* apresentam maiores titulações, requerem longo tempo para aparecer e assim, indicam exposição continuada à bactéria. Neste contexto, altos níveis de anticorpos para a fase I, em amostras mais tardias, em combinação com a constante ou queda dos níveis de anticorpos de fase II e outros sinais de doença inflamatória podem sugerir febre Q crônica. Sabe-se que os anticorpos contra antígenos de fase I e II persistem por meses ou anos após a infecção inicial (Maurin & Raoult 1999, Angelakis & Raoult 2010).

A primeira descrição de febre Q em território brasileiro foi em 1953, em São Paulo. Embora existam estudos soropidemiológicos que evidenciaram a circulação de *C. burnetii* em população considerada de risco, só recentemente casos de febre Q têm sido identificados e todos, até o momento, foram confirmados com base no teste sorológico, isto é, pela detecção de anticorpos anti-*C. burnetii* e pela coloração de Gimenez em fragmento tecidual de válvula endocárdica (Brandão et al. 1953, Costa et al. 2006, Lamas et al. 2009, Ribeiro do Valle et al. 1955, Riemann et al. 1974, Siciliano et al. 2008, Travassos et al. 1954).

Mais recentemente, no Rio de Janeiro, a análise sorológica em pacientes, HIV reativos, atendidos em serviço de saúde na região administrativa de Jacarepaguá, Município do Rio de Janeiro, identificou quatro pacientes do sexo feminino com anticorpos anti-*C. burnetii* (Lamas et al. 2009). Em outubro de 2008, um caso de febre de origem obscura há mais de 40 dias associada com trombocitose, internado no Hospital Universitário Gaffrée Guinle, foi confirmado como febre Q, após resposta terapêutica à antibioticoterapia específica. O teste sorológico de imunofluorescência indireta (IFA) mostrou a presença de anticorpos anti- *C. burnetii* e a análise molecular (PCR) possibilitou a identificação do genoma bacteriano, confirmando, assim, o diagnóstico laboratorial de febre Q.

## 2- REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1- Histórico

Em 1933, uma doença de etiologia desconhecida foi pela primeira vez identificada em trabalhadores de abatedouro em Brisbane, Queensland, Austrália. Os pacientes apresentavam febre, cefaléia e mal-estar e todos os testes laboratoriais para pesquisa de um grande número de patógenos foram negativos. Por se tratar de uma doença de etiologia desconhecida, ela passou a ser denominada de febre Q (a partir da palavra “query”), um termo proposto, em 1937, por Edward Holbrook Derrick, que nesta década era o diretor do Laboratório de Microbiologia e Patologia do Departamento de Saúde de Queensland. Responsável pela investigação pelo então desconhecido agravo febril, Derrick inoculou sangue e urina de pacientes em cobaias. A consequente resposta febril, assim como, a passagem sucessiva para outros animais possibilitaram a confirmação de que se tratava de um agente infeccioso transmissível. Apesar de todos os esforços, o agente não foi isolado em qualquer meio de cultura e foi especulado de que se tratava de um agente viral. (Maurin & Raoult 1999, McDade 1990 *apud* Angelakis & Raoult 2010).

Posteriormente, MacFarlane Burnet e seu sócio Mavis Freeman, a quem Derrick havia enviado amostra do material infeccioso, isolaram uma bactéria intracelular fastidiosa dos animais inoculados. Eles reproduziram a doença em cobaias e também em outros animais, incluindo camundongos e macacos. Burnet e Freeman examinaram diversas secções coradas pela hematoxilina-eosina do baço de camundongos infectados e, observaram vacúolos intracelulares preenchidos com material granular. O estudo histopatológico utilizando a coloração pelos métodos de Castañeda e/ou Giemsa, permitiu a visualização de vários pequenos bastonetes que pareciam de natureza rickettsial (Maurin & Raoult 1999, Angelakis & Raoult 2010). Com estes resultados, Derrick e colaboradores investigaram a epidemiologia da doença, especialmente o papel potencial de um vetor artrópode, e concluíram que os animais selvagens eram os reservatórios naturais da febre Q, tendo os animais domésticos o papel de reservatórios secundários, e que o agente da doença podia ser transmitido por carrapatos ou outros artrópodes (Maurin & Raoult 1999).

Em 1935, independente do trabalho de Derrick na Austrália, Gordon Davis, no Laboratório de Rocky Mountain, em Hamilton, Montana, Estados Unidos, estava investigando a ecologia da febre maculosa. Ele observou que carrapatos coletados na área de Nine Mile Creek causavam uma resposta febril nas cobaias que se alimentavam. Foi observada também que a infecção podia ser passada de cobaia a cobaia através de inoculação de sangue. A análise das células inflamatórias das cobaias infectadas revelou

microorganismos “rickettsia-like”, embora a doença no animal não fosse compatível de febre maculosa. Assim, diferente do que ocorreu em Queensland, embora o agente tivesse sido comprovadamente infeccioso, a doença era desconhecida nos Estados Unidos. Então em 1936, Herald Rea Cox associando-se a Davis no Laboratório das Montanhas Rochosas, com o intuito de caracterizar ainda melhor o "agente Nine Mile", demonstraram como Burnet e Freeman, que se tratava de um agente filtrável, com propriedades oscilando entre vírus e rickettsias. O maior avanço foi obtido em 1938, quando Cox conseguiu propagar o agente infeccioso em ovos embrionados. A ligação entre os grupos de Montana e Brisbane, surgiu quando uma infecção de febre Q adquirida, laboratorialmente, ocorreu no Laboratório de Rocky Mountain, em 1938. Rolla Eugene Dyer, diretor dos Institutos Nacionais de Saúde, foi para Hamilton para verificar a possibilidade de cultivar o "agente Nine Mile" em ovos, quando foi infectado no laboratório. A doença febril foi reproduzida em cobaias inoculadas com sangue de Dyer e rickettsias foram identificadas em amostras de baço dos animais infectados. Na mesma época foi possível demonstrar a imunidade cruzada entre cepas isoladas do sangue de Dyer e do "agente Nine Mile". Dyer, em seguida, estabeleceu uma ligação definitiva entre o "agente Nine Mile" e o agente da febre Q australiano. Amostras de baço removidas de camundongos infectados com o agente da febre Q, enviadas por Burnet foram inoculadas por Dyer em cobaias e assim foi possível demonstrar que tais animais estavam protegidos de um novo desafio com a cepa isolada de seu sangue. Tal imunidade cruzada foi indicativa de que o agente da febre Q, do isolado do sangue de Dyer e do "agente Mile Nine", eram de fato isolados de um mesmo microorganismo. Inicialmente o agente etiológico da febre Q foi denominado como *Rickettsia burnetii* e *Rickettsia diaporica*, sendo renomeado como *Coxiella burnetii*, homenageando Cox e Burnet, que identificaram o agente da febre Q como uma nova espécie de rickettsia (Maurin & Raoult 1999).

## **2.2- Caracterização do Agente Etiológico**

### **2.2.1- Classificação do Agente Etiológico**

*Coxiella burnetii* é uma pequena bactéria intracelular obrigatória Gram-negativa e pleomórfica (0,2 a 0,4 µm de largura, 0,4 a 1 µm de comprimento) (Figura 2.1). Apesar de possuir uma membrana semelhante a das bactérias Gram-negativas, geralmente não é corada pela técnica de Gram. O método de Gimenez (Gimenez 1964) é indicado na coloração de *C. burnetii* em amostras clínicas ou culturas de laboratório. Uma vez que *C. burnetii* não pode ser cultivada em meio axênico e tem sido recuperada de carrapatos, foi inicialmente classificada na ordem Rickettsiales, na família Rickettsiaceae, e no grupo Rickettsias, junto

com os gêneros *Rickettsia* e *Rochalimaea* (Weiss e Moulder 1984 *apud* Maurin & Raoult 1999). No entanto, investigações filogenéticas recentes, baseadas na análise da sequência 16S rRNA, mostraram que o gênero *Coxiella* pertence à subdivisão gama de Proteobacteria, com os gêneros *Legionella*, *Francisella* e *Rickettsiella*, como seus parentes mais próximos (Figura 2.2), enquanto que as bactérias do gênero *Rickettsia* pertencem ao subgrupo alfa-1 de Proteobacteria, e as espécies do gênero *Rochalimaea*, atualmente reclassificados dentro do gênero *Bartonella*, incluídos no subgrupo alfa-2 de Proteobacterias (Maurin & Raoult 1999, Angelakis & Raoult 2010).

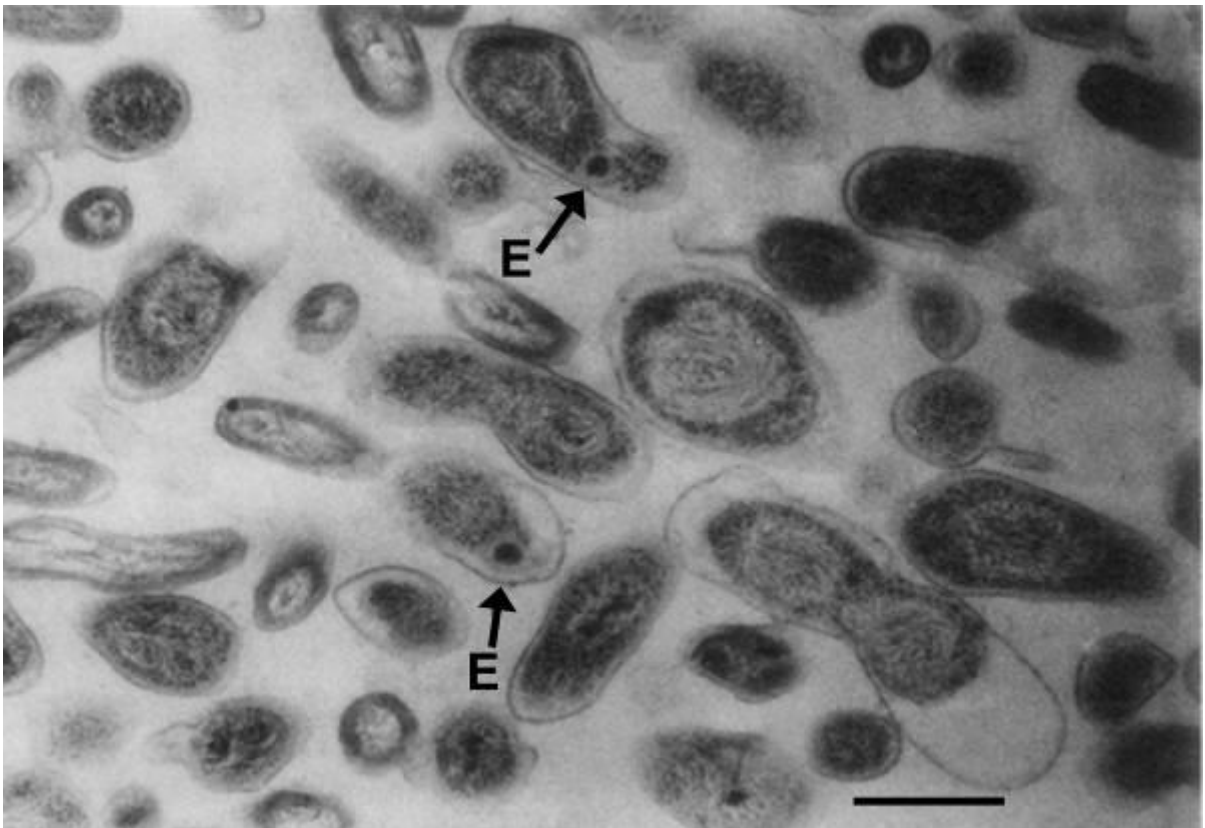


Figura 2.1: Detalhe de imagem em micrografia eletrônica de seções finas de células de *Coxiella burnetii*, dois LCVs (variante de grandes células) com endósporos (E) (setas). Barra, 0,4  $\mu\text{m}$  (McCaul & Williams 1981).

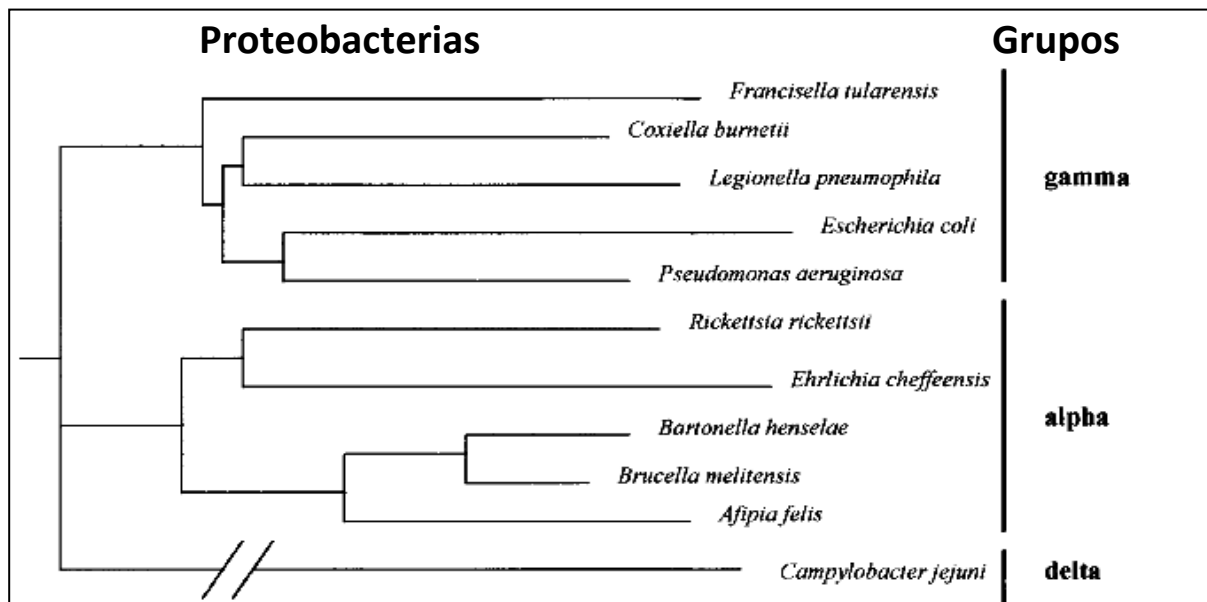


Figura 2.2: Árvore filogenética mostrando as relações de *C. burnetii* com outras espécies pertencentes à Proteobactérias. A árvore foi construída pelo método de agrupamento de semelhantes com sequências de genes 16S rRNA (Maurin & Raoult 1999).

*Coxiella burnetii* possui um cromossomo pequeno circular de aproximadamente 5 Mbp. A maioria dos isolados abriga adicionalmente um de quatro plasmídeos previamente descritos, com tamanho de 32 a 51 kb, que transportam cerca de 2% da informação do genoma (Angelakis & Raoult 2010). A análise do genoma tem revelado a presença de numerosos elementos móveis e pseudogenes, indicando que a plasticidade e a redução de seu genoma ainda estão em curso. Essas observações e comparações com os genomas de outras bactérias intracelulares obrigatórias sequenciadas, sugerem que *C. burnetii* pode ter sofrido uma transição mais recente em seu ciclo de vida atual (Seshadri et al. 2003).

### 2.2.2- Variações Antigênicas

*Coxiella burnetii* apresenta variações antigênicas semelhantes à variação lisa-rugosa da família Enterobacteriaceae. A variação de fase está relacionada principalmente à mutação no lipopolissacarídeo (LPS). A fase I é a fase natural encontrada nos animais infectados, artrópodes, ou seres humanos. É altamente contagiosa (uma única bactéria pode infectar um humano) e corresponde ao LPS de variação lisa (Maurin & Raoult 1999). LPS fase I, com sua estrutura de carboidratos estendida, bloqueia o acesso de anticorpos para proteínas de superfície. Isso explicaria pelo menos em parte, porque a bactéria persiste em locais desconhecidos após recuperação de casos agudos de febre Q, acompanhado por soropositividade ao longo da vida (Fournier et al. 1998). Em contraste, a fase II não é muito infecciosa e é obtida somente em laboratórios, após passagens seriadas em culturas celulares

ou em ovos embrionados. Corresponde ao LPS da variação rugosa. Comparado a fase I, a fase II exibe uma LPS truncada e, carece de algumas proteínas determinantes da superfície celular (Maurin & Raoult 1999, Angelakis & Raoult 2010).

Microorganismos, incluindo aqueles intracelulares, usam receptores específicos eucarióticos, como as integrinas para invadir células hospedeiras. *Coxiella burnetii* fase II penetra nos macrófagos humanos, a partir do receptor CR3, enquanto, *C. burnetii* fase I infecciosa, ao contrário, bloqueia a entrada através do receptor CR3 e se liga a monócitos humanos pelo complexo de LRI (leucócitos resposta integrina,  $\alpha v\beta 3$ ) e IAP (integrina-associada proteína). Assim, enquanto *Coxiella burnetii* de fase I é apenas mal internalizada pelos monócitos e macrófagos, e sobrevivendo dentro dessas células, a bactéria na fase II é interiorizada com facilidade pelos monócitos e macrófagos e de forma rápida eliminada pela via fagolisossomial (Maurin & Raoult 1999).

### 2.2.3- Ciclo de Vida Intracelular

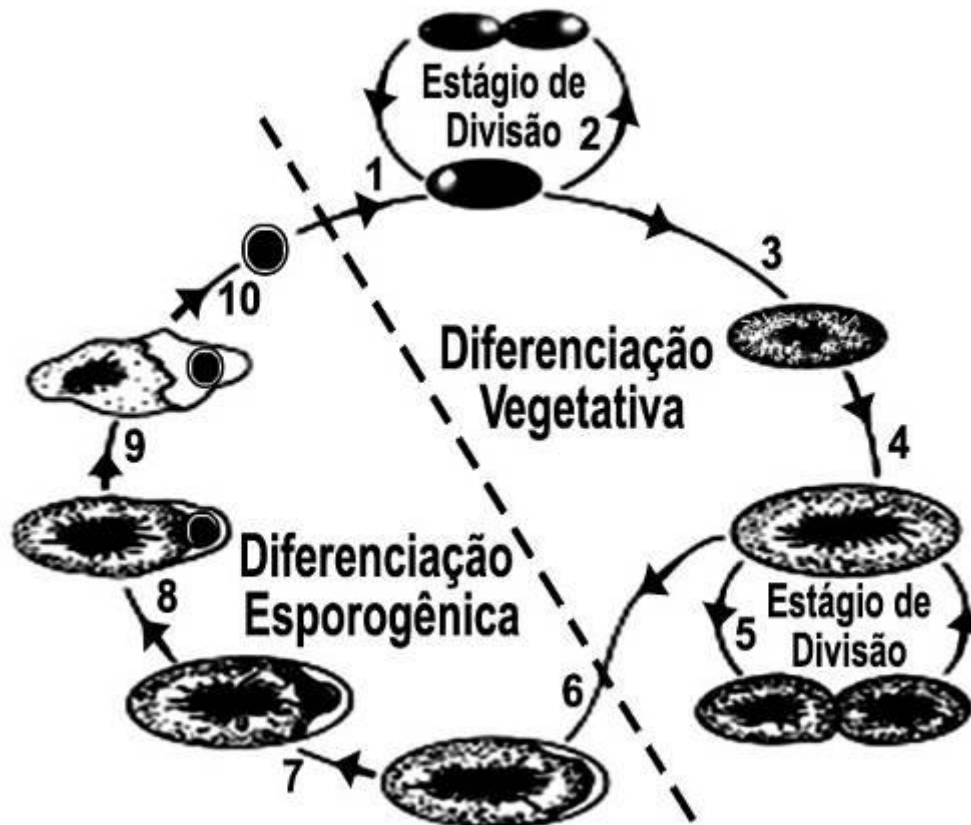
Em infecções naturais, *Coxiella* tem um tropismo por células do sistema mononuclear fagocitário, como macrófagos alveolares do pulmão, células de Kupffer do fígado e mais raramente observada, em pneumócitos, fibroblastos e células endoteliais. Já em sistemas de cultura de células *in vitro*, *Coxiella* infecta uma grande variedade de tipos celulares, e muitas linhagens de células epiteliais e “fibroblastos-like” têm sido usados como modelos para estudar as interações da *Coxiella* e o hospedeiro (Voth & Heinzen 2007). Esta grande variedade de tipos celulares e de hospedeiros com capacidade de crescimento de *C. burnetii* se encontra disposta, de forma simplificada, na tabela abaixo:

Tabela 2.1: Tipos de células em sistemas de cultura (*in vitro*) que permitem crescimento de *C. burnetii* e seus respectivos hospedeiros.

Tipo de célula	Tecido de origem	Hospedeiro
Vero	célula epitelial de rim	macaco verde Africano
BHK-21	fibroblastos de rim	hamster
L-929	fibroblastos	murino
HEL	fibroblastos de pulmão	embriões humanos
HeLa	células epiteliais cervicais	humanos
CHO	fibroblastos de ovário	hamster chinês
J774A.1	linhagens de células macrófagos-like	murino
P388D1	linhagens de células macrófagos-like	murino
THP-1	linhagens de células monócitos-like	humanos
monócitos / macrófagos	<i>in vitro</i>	humanos
células dendríticas	<i>in vitro</i>	humanos

A estrutura e o metabolismo celular peculiar deste organismo são a base para sua estabilidade, com a qual realiza o seu ciclo de desenvolvimento no fagolisossoma de células eucarióticas. Estudos realizados sobre o ciclo de vida de *C. burnetii*, utilizando análise ultraestrutural e microscopia eletrônica de transmissão, revelaram pleomorfismo extremo, com a identificação de dois tipos celulares morfológicos: uma variante de grandes células (LCVs) e outra de pequenas células (SCVs) (McCaul & Williams 1981). Os resultados obtidos indicaram que *C. burnetii* tem certas características comparáveis às de bactérias que sofrem diferenciação levando à formação de endósporos. O ciclo de desenvolvimento pode ser iniciado em coincidência com a fagocitose do esporo ou SCV por uma célula fagocítica. Após a entrada das SCVs no fagolisossoma, o pH ácido do fagolisossoma pode ativar o metabolismo generalizado de *C. burnetii*. As SCVs podem ser submetidas à multiplicação por fissão binária transversal e como alternativa, podem também se diferenciar em variante de células vegetativas. Mudanças iniciadas pelo pH, sistemas enzimáticos e / ou estado nutricional no fagolisossoma são admitidos como mecanismos de desencadeamento que induzem à diferenciação vegetativa. Nesta fase, as membranas multicamadas devem tornar-se menos visíveis, o nucleóide denso começa a se dispersar. Como outra diferenciação das LCVs, cita-se o estágio de divisão binária transversal. De forma alternada, o estágio da divisão pode coincidir com a diferenciação esporogênica, resultando na divisão celular desigual. Mudanças iniciadas durante a infecção progressiva das células eucarióticas podem ser um sinal da LCV para o desencadeamento da esporogênese. Na verdade, a célula eucariótica torna-se preenchida com o fagolisossoma contendo grande quantidade de *C. burnetii* em diferentes estágios de desenvolvimento. O lançamento do esporo da LCV ocorre após a lise da LCV e pode levar à maturação do SCV (Figura 2.3). A descoberta de diferenciação esporogênica pela *C. burnetii* deve facilitar estudos futuros sobre a patogenicidade da bactéria considerando a contagiosidade e resistência, uma vez que os fatores fisiológicos e bioquímicos envolvidos na formação e germinação de endósporos, ainda estão sendo investigados (McCaul & Williams 1981).





(1) O ciclo de desenvolvimento pode ser iniciado coincidente com absorção dos esporos ou SCV por uma célula fagocítica. (2) O SCV pode sofrer multiplicação por fissão binária transversal. (3 e 4) Como alternativa, o SCV podem se diferenciar para a variante de células vegetativas. (5) maior diferenciação do LCV pode passar a uma fase de divisão transversal binária. (6) Como alternativa, o estágio da divisão pode coincidir com a diferenciação esporogênica. (7, 8 e 9) Sequências durante a diferenciação esporogênica incluindo o desenvolvimento polar dos esporos variando de 130-170 nm de diâmetro. (10) Expulsão do esporo da LCV pode ocorrer após a lise da LCV. Lançamento do esporo da LCV pode levar à maturação do SCV.

Figura 2.3: Esquema do ciclo de desenvolvimento de *C. burnetii* no fagolisossomo das células eucarióticas (McCaul & Williams 1981).

#### 2.2.4- Imunidade versus Mecanismos de Sobrevivência da Bactéria

Como os fagócitos mononucleares são tipicamente responsáveis pela fagocitose e morte de patógenos invasores, o fato da bactéria *C. burnetii* preferencialmente residir em fagolisossomas dentro dessas células determina a ocorrência de alguns eventos interessantes para o sistema imune do hospedeiro que serão descritos a seguir. Assim, ao contrário de outros patógenos intracelulares, tais como *Mycobacterium spp.* e *Legionella pneumophila*, *C. burnetii* não altera a fusão fagossomo-lisossomo e cria um nicho de replicação neste comportamento onde encontra um pH moderadamente ácido (< 5) necessário para seu metabolismo e subsequente replicação (Shannon e Heinzen 2009).

Pelo fato de poder resistir aos efeitos microbicidas de intermediários reativos de oxigênio através da ação de removedores de oxigênio, tais como, superóxido dismutase e catalase (Maurin & Raoult 1999), a forma virulenta de *C. burnetii*, de forma produtiva, infecta os fagócitos mononucleares *in vivo* e essas células parecem incapazes de controlar o crescimento das bactérias em animais “naive”. Curiosamente, LPS de *C. burnetii* fase I de comprimento integral (estendida) não estimula os macrófagos e pode ser um antagonista do TLR4, um receptor do tipo Toll para LPS das bactérias Gram-negativas. Estudos conduzidos por Honstetter e colaboradores (2004) mostraram que TLR4 participa da captação bacteriana já que a TLR4 controla os eventos iniciais da infecção por *C. burnetii*, como a fagocitose dos macrófagos, formação de granuloma e produção de citocinas. No entanto, camundongos “knockout” de TLR4 não parecem ser deficientes em sua capacidade de controlar infecção por *C. burnetii*. Zamboni e colaboradores (2004) demonstraram que *C. burnetii* avirulenta estimula macrófagos através de TLR2. No entanto, devido à baixa dose infecciosa de *C. burnetii* (menos de 10 organismos viáveis), o sistema imune inato parece incapaz de conter a infecção primária em um grande número de indivíduos expostos (Shannon & Heinzen 2009). Estas observações confirmam a necessidade de mais estudos para uma maior compreensão da interação *C. burnetii* e o sistema imune do hospedeiro.

A fixação de formas virulentas de *C. burnetii* em monócitos é mediada apenas por integrina  $\alpha\beta3$ , enquanto a interação de formas avirulentas com monócitos necessita da mediação de integrinas  $\alpha\beta3$  e receptor 3 do complemento (CR3). Assim, é provável que a variante virulenta iniba a internalização mediada pela CR3 através do comprometimento de interações cruzadas entre as duas integrinas e que *C. burnetii* escape da fagocitose por interferir com a distribuição espacial do receptor 3 do complemento na superfície dos fagócitos (Marrie 2006).

A doença crônica é caracterizada pela resposta imunológica celular e pela atividade microbicida de monócitos. Tem sido observado que a interleucina 4 induz a replicação de *C. burnetii* em monócitos, mas não em macrófagos, levando a uma estimulação de resposta imune Th2 que pode interferir no controle imunológico da febre Q com um potencial de aumento da regulação das IL-5, IL-4 e IL-10 e um grau variável de síntese de IgE, ou mesmo, de formação de fator reumatóide (FR) (Izzo e Marmion 1993, Ghigo et al. 2003, Marrie 2006). Em adição, salienta-se que as prostaglandinas podem suprimir a imunidade mediada por células T contra *C. burnetii* e que grande quantidade de prostaglandina E2 é produzida em resposta ao microorganismo por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com endocardite. Citocinas, como fator de crescimento transformador  $\beta$  e IL-10, são produzidas em excesso também pelas PBMC e

monócitos de pacientes com endocardite por febre Q. Além disso, o aumento da produção de IL-10 está associado à recidiva da febre Q (Maurin & Raoult 1999).

O controle da infecção primária de febre Q envolve resposta sistêmica imune mediada por células e formação de granuloma (Angelakis & Raoult 2010). Controle imunológico de *C. burnetii* é dependente de células T, mas não leva a erradicação da bactéria, e em consequência, uma imunossupressão pode levar a uma recaída. (Honstetter et al. 2004, Marrie 2006). De fato, o DNA de *C. burnetii* persiste anos após uma febre Q aguda em monócitos e na medula óssea (Harris et al. 2000). Autores relatam uma relação entre a síndrome da fadiga pós-febre Q (QFS) com a desregulação das citocinas e imunomodulação da persistência de *C. burnetii*. (Penttila et al. 1998, Harris et al. 2000).

Por fim, dados indicam que *C. burnetii* pode interferir com a via intrínseca de morte celular durante a infecção através da produção de proteínas que, direta ou indiretamente, impedem a liberação de citocromo C da mitocôndria. É provável que a inibição de apoptose por *C. burnetii* represente uma importante propriedade de virulência que permite que este patógeno intracelular obrigatório mantenha a viabilidade da célula hospedeira, apesar dos indutores de “stress” que normalmente ativam a via intrínseca de morte celular (Lührmann & Roy 2007).

Ainda há a persistente infecção celular relatada por Roman e colaboradores (1986), demonstrando que células infectadas são capazes de divisão e no processo de separar o vacúolo parasitóforo em uma das células filhas emergentes; a célula filha companheira emerge livre de parasita. Esta divisão assimétrica de células infectadas revelada através de fotomicrografia de células coradas (Figura 2.4) dá uma explicação para o aparecimento de células não infectadas dentro de populações de células hospedeiras que anteriormente eram 100% infectadas.

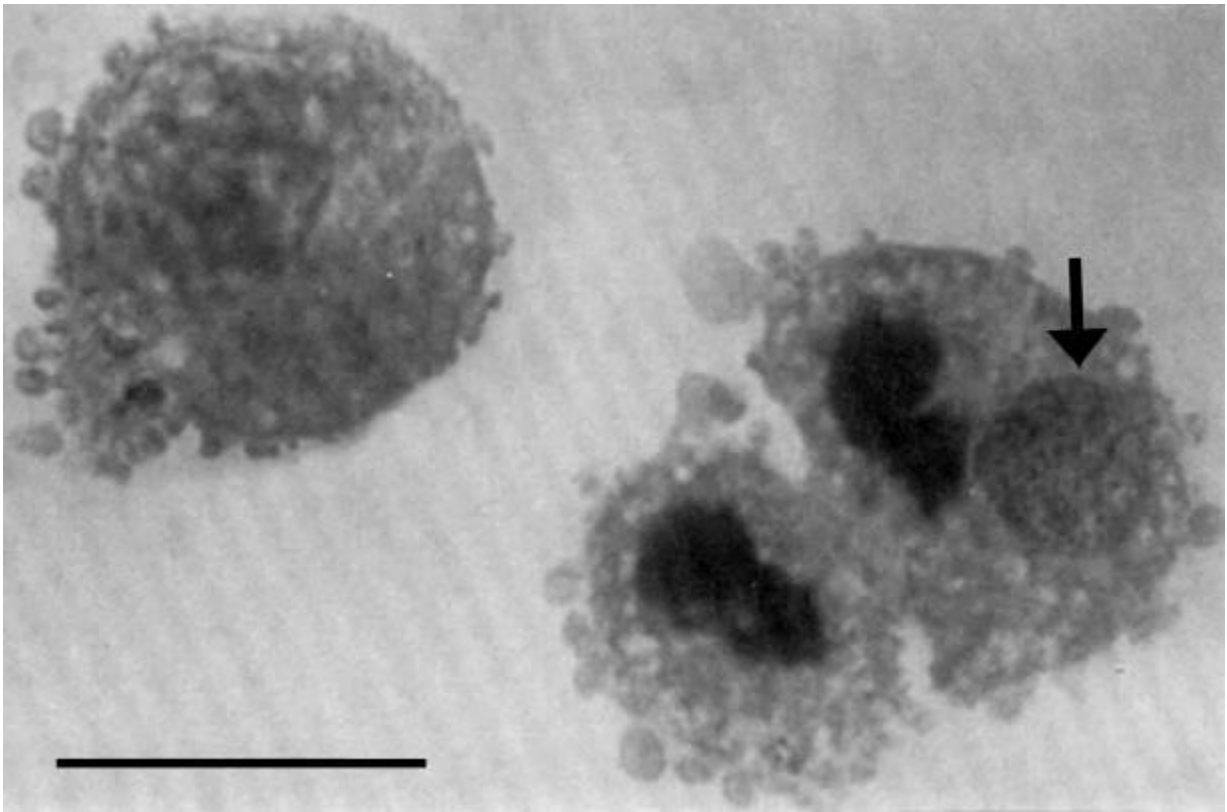


Figura 2.4: Células L929 infectadas com *C. burnetii* fase I em telófase com uma célula filha emergente infectada (seta) e uma célula filha livre de parasita. Ao lado uma célula normal não infectada. A fotomicrografia foi feita de células continuamente infectadas por 465 dias. Barra, 5  $\mu$ m. (modificado de Roman et al. 1986).

### 2.2.5- Mecanismos de Eliminação da Bactéria

Surpreendentemente, a virulenta *C. burnetii* fase I estimula muito a síntese de fator de necrose tumoral (TNF) por monócitos humanos. Isso aumenta o potencial microbicida de monócitos infectados e, portanto, pode restringir o crescimento intracelular de *C. burnetii*. No entanto, TNF- $\alpha$  pode também aumentar a ingestão da *C. burnetii* de fase I, que é mal internalizada pelos monócitos-macrófagos por alta regulação de receptores de adesão sobre essas células. A indução de funções microbicidas de fibroblastos de rato por interferon gama (IFN- $\gamma$ ) *in vitro* limita a multiplicação intracelular de *C. burnetii*. Experimentações recentes têm demonstrado que IFN- $\gamma$  promove a morte de *C. burnetii* em monócitos THP-1 através de um mecanismo de apoptose mediado em parte pela TNF.

Linfócitos do sangue periférico (PBL) de pacientes convalescentes ou de doença ativa de febre Q aguda manifestam uma resposta proliferativa marcada quando cultivados *in vitro* com antígenos de *C. burnetii*. A resposta linfoproliferativa também é observada em pessoas logo após a vacinação com *C. burnetii* inativada com formalina (Maurin & Raoult 1999).

### 2.3- Patogenia

Os dados atualmente disponíveis para os seres humanos e modelos animais levam a várias hipóteses sobre a patogênese da febre Q. A febre Q aguda em seres humanos pode variar de infecção assintomática à doença fatal e pacientes sintomáticos apresentando várias manifestações clínicas como, pneumonia, hepatite, encefalite, ou miocardite.

Quatro fatores contribuem e podem explicar essa variação na apresentação clínica da febre Q: (i) a via de infecção por *C. burnetii*, incluindo aerossol ou via digestiva; (ii) a dose de inoculação de *C. burnetii*, (iii) a variante infectante de *C. burnetii*, que pode apresentar potenciais de virulência diversos; e (iv) fatores do hospedeiro, incluindo o estado imunológico do paciente infectado (Maurin & Raoult 1999).

Com relação às variantes infectantes de *C. burnetii* e a imunopatogenicidade na febre Q, Izzo e Marmion (1993) sugerem que as bactérias de fase I que se multiplicam no fagolisossoma de macrófagos teriam uma vantagem de sobrevivência pela baixa regulação da produção de IFN- $\gamma$ , já que de outra forma, a célula hospedeira seria ativada com geração de metabólitos bactericidas. Evento inverso ocorre com *C. burnetii* na fase II, mais facilmente eliminadas pela sua incapacidade de restringir a resposta IFN- $\gamma$ , consequência, talvez, dos seus LPS truncados que se ligam a outros receptores de CD14 no macrófago.

A via de inoculação *C. burnetii* em humanos também pode determinar em parte a manifestação clínica predominante, com pneumonia sendo mais frequente quando ocorre através de aerossóis contaminados. A hepatite granulomatosa passa a ser a manifestação clínica predominante quando a transmissão ocorre através da ingestão de leite cru. Nos seres humanos, a gravidade da febre Q aguda também tem sido associada em função da dose do inóculo infectante. Finalmente, fatores do hospedeiro, em especial o estado imunológico nos infectados, sejam decorrentes de um estado de imunodepressão ou mesmo gravidez, podem influenciar o curso da infecção, incluindo a evolução para doença crônica (Maurin & Raoult 1999).

### 2.4- Epidemiologia

#### 2.4.1- Vias de exposição

A via de aerossol é o principal modo de contaminação humana com *C. burnetii*. Contaminação por aerossóis pode ocorrer diretamente a partir de fluidos provenientes da parturição de animais infectados, contaminando animais recém-nascidos, placenta, ou lã. *Coxiella burnetii* é muito resistente à destruição em natureza, dispersando-se pelo vento e

sobrevivendo durante várias semanas em áreas onde os animais estiveram presentes. Assim, febre Q pode ocorrer em pacientes sem qualquer contato evidente com os animais, isto é, a distância (ad distans).

Ingestão (principalmente beber leite cru) é um fator menos provável na transmissão de *C. burnetii* e é até hoje um ponto de controvérsia. A transmissão de pessoa para pessoa é um evento extremamente raro. Embora infrequentes, casos esporádicos de febre Q humana têm sido identificados: i) após o contato com uma parturiente infectada (em um obstetra que realizou um aborto), ii) via de transmissão transplacentária resultando em infecções congênitas, iii) durante as necropsias, iv) através de inoculação intradérmica, ou v) através de transfusão de sangue.

Apesar de *C. burnetii* ter sido isolada de artrópodes, principalmente carrapatos, é improvável que a transmissão da febre Q por artrópodes em humanos seja significativa, embora cães possam ser infectados por picada de carrapato. Salienta-se que os vetores biológicos desempenham um papel significativo na transmissão de *C. burnetii* entre os vertebrados silvestres, em particular nos roedores, lagomorfos e aves selvagens (Angelakis & Raoult 2010). A transmissão sexual de *C. burnetii* foi demonstrada experimentalmente em camundongos infectados, no entanto, este modo de transmissão ainda não foi estabelecido em seres humanos e animais selvagens (Maurin & Raoult 1999).

#### **2.4.2- Ciclo de vida e manutenção na natureza**

Dois ciclos principais da perpetuação da infecção por *C. burnetii* em natureza foram identificados: o primeiro, em animais domésticos e o segundo, na região de floresta com a participação de animais silvestres (marsupiais, roedores, lagomorfos, etc.) e alguns ectoparasitas, principalmente, carrapatos. Carrapatos podem desempenhar um papel significativo na transmissão de *C. burnetii* entre os vertebrados. As relações entre os dois ciclos epidemiológicos se encontram esquematizadas na figura abaixo com base nas informações obtidas de fontes bibliográficas de diversos autores (Figura 2.5), considerando que os carrapatos, animais capazes de permanência no ambiente por longo período, atuam como elemento de ligação dos ciclos, entre animais selvagens e domésticos.

Assim, além dos ruminantes, animais de estimação, incluindo gatos, coelhos e cães, têm sido identificados como potenciais fontes de surtos urbanos (Angelakis & Raoult 2010).

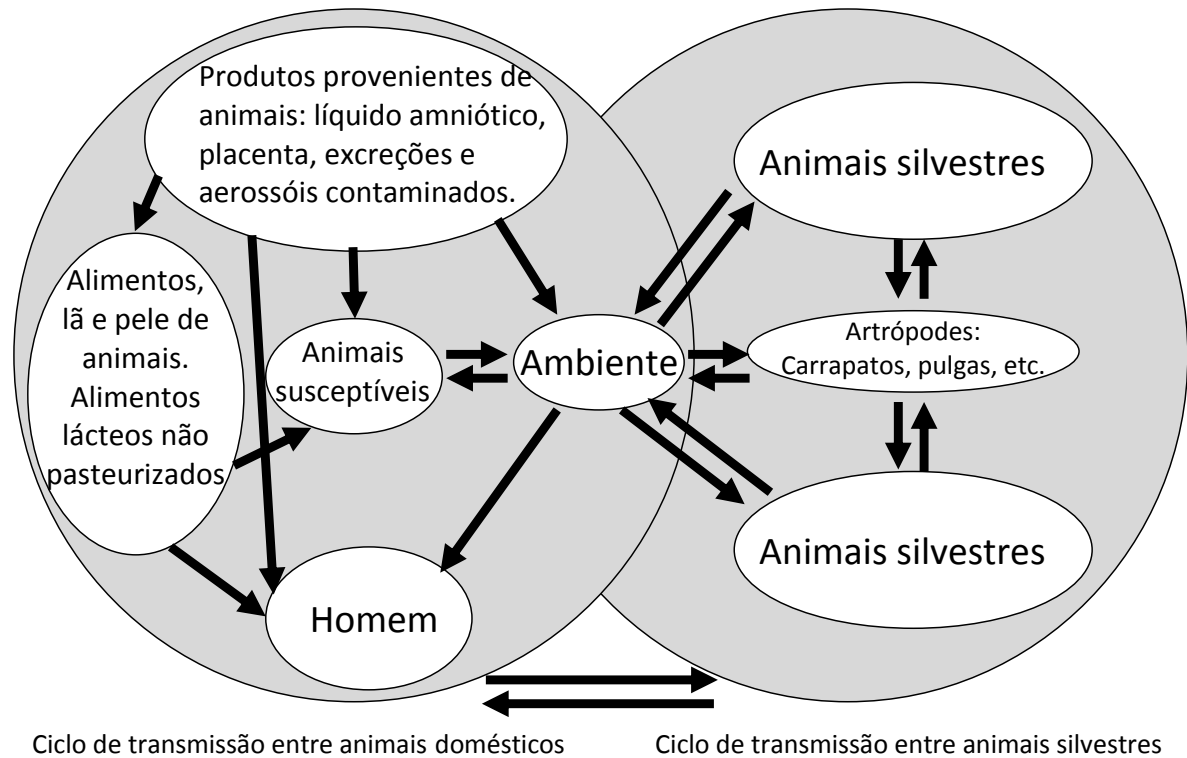


Figura 2.5: Figura esquemática ilustrando a inter-relação entre os ciclos da perpetuação da infecção na natureza entre animais domésticos e animais silvestres.

### 2.4.3- Reservatórios

Os reservatórios são inúmeros, mas parcialmente reconhecidos incluindo-se mamíferos, aves e vetores biológicos (carrapatos). Cerca de 40 espécies ou mais de carrapatos são naturalmente infectados com *C. burnetii*, mas não são importantes na manutenção das infecções em animais domésticos ou em seres humanos (Maurin & Raoult 1999). *Coxiella burnetii* se multiplica, nas células do intestino de carrapatos e um grande número de organismos viáveis são eliminados pelas fezes. Couros e lãs contaminados são veículos de transmissão para as pessoas tanto pelo contato direto como através das fezes secas, inaladas como partículas de poeira suspensas no ar (Angelakis & Raoult 2010). Embora um importante reservatório pareça ser de pequenos roedores silvestres, a fonte mais comumente identificada de infecção humana são animais de área agrícola como bovinos, caprinos e ovinos. Animais de estimação, incluindo gatos, coelhos e cachorros, também podem ser fontes potenciais de surtos urbanos. Suspeita-se que os gatos sejam um importante reservatório de *C. burnetii* em áreas urbanas. No Canadá, estudos têm demonstrado que 6 a 20% dos gatos apresentam anticorpos anti-*C. burnetii* (Fournier et al. 1998). Na América do Norte, surtos de febre Q são relacionados ao contato direto e indireto com gatas parturientes e assim como pela exposição às fezes de pombos infectados (Angelakis & Raoult 2010). Suspeita-se que os ratos silvestres

sejam importantes reservatórios na Grã-Bretanha. Todos estes mamíferos, quando infectados, eliminam organismos resistentes à dessecação através de urina, fezes, leite e em especial em produtos de parturição, considerando que *C. burnetii* se localiza no útero e glândulas mamárias de animais infectados. A ocorrência de reativação da infecção em mamíferos do sexo feminino durante a gravidez assim como a infecção podem resultar nos abortos em cabras e, em menor escala, em ovinos, além de problemas reprodutivos em bovinos. Concentrações elevadas de *C. burnetii* (até  $10^9$  bactérias / g de tecido) têm sido encontradas nas placentas de animais infectados, assim como no leite, embora provavelmente esse veículo seja menos efetivo na propagação de febre Q (Fournier et al. 1998, Maurin & Raoult 1999, Angelakis & Raoult 2010).

#### 2.4.4- Situação Mundial

A febre Q é um importante problema de saúde pública em diversos países em especial na França (Frankel et al. 2011) como também na Espanha (Montes et al. 2006) e na Holanda, onde, mais de 3,500 casos foram notificados nos últimos três anos (Van der Hoek et al. 2010, Hilbert et al. 2011, Roest et al. 2011, Sprong et al. 2011, Whelan et al. 2011). *Coxiella burnetii* é responsável por 5 a 8% dos casos de endocardite infecciosa no sul da França e quadros de febre Q ocorrem em 50 por cada 100.000 habitantes nessa área (Bélec et al. 1993, Fenollar et al. 2004, Houpijian & Raoult 2005, Stein & Raoult 1995, Lamas & Eykyn 2003, Maurin & Raoult 1999). Dados mais recentes mostram que em todo território francês, a incidência anual de febre Q aguda e endocardite é de 2.5/100,000 pessoas e 0.1/100,000 pessoas, respectivamente, com aumento expressivo de casos e surtos nos últimos anos (Frankel et al. 2011).

Desde a primeira publicação sobre a emergência de febre Q na Holanda, milhares de casos têm sido notificados (Karagiannis et al. 2007, Cilla et al. 2008, Schimmer et al. 2008, Karagiannis et al. 2009, Delsing et al. 2010, Enserink 2010, Roest et al. 2011, Van den Wijngaard et al. 2011, Van der Hoek et al. 2011) e estudo realizado em pequenos ruminantes demonstrou que, o mesmo genótipo de *C. burnetii* identificado nestes animais tenha sido responsável pela epidemia de febre Q na Holanda (Roest et al. 2011). No entanto, outro estudo, conduzido por Klaassen e colaboradores, identificou cinco genótipos de *C. burnetii* em seis pacientes e seis animais provenientes de três regiões diferentes da Holanda (Klaassen et al. 2009). Com base na epidemia de febre Q ocorrida na Holanda, artigos sobre a aplicação e a importância de um sistema de vigilância eficiente, voltado para a identificação precoce tem sido enfatizado (Roest et al 2011, Van den Wijngaard et. al., 2011). Já em 2005, estudos de soroprevalência sugeriam que a febre Q era endêmica, acometendo cabras e ovelhas leiteiras, embora sem



diagnóstico conclusivo. Salienta-se ainda que abortos por febre Q foram registrados em 30 fazendas de cabras e ovelhas leiteiras entre 2005 e 2009. Diante do exposto, foi possível estabelecer um elo epidemiológico da epidemia de febre Q na Holanda respaldado no elevado número de pessoas susceptíveis e os seus contatos diretos ou indiretos com pequenos ruminantes com história clínica de abortos frequentes (Roest et al. 2011).

Na Alemanha, no período de 2008 a 2009, dois surtos consecutivos de febre Q em seres humanos foram registrados. Admitiu-se que a origem da infecção do primeiro foco tenha sido um rebanho de 550 ovelhas vivendo entorno das vilas afetadas, entretanto a fonte de infecção do surto de 2009, não pode ser identificada. Provavelmente, os prados contaminados com placentas infectadas ou os fluidos dos nascimentos foram incriminados (Hilbert et al. 2011).

Ainda em 2008, em um hospital de campanha britânico em Helmand, no Afeganistão, 26% de todos os casos inespecíficos de febre submetidos a um protocolo padrão foram confirmados como febre Q aguda, razão para instituir um programa de vigilância (Bailey et al. 2011).

Nos Estados Unidos, a febre Q é uma doença de notificação desde 1999, sendo que 80 casos são notificados anualmente, com um pico de 171 casos em 2007 e com uma incidência média anual de 0,28 /100,000 pessoas (Anderson et al. 2009).

No Brasil, descrita pela primeira vez em 1953, a febre Q, apesar de ser uma zoonose cosmopolita é negligenciada, talvez pelo desconhecimento das histórias clínicas humanas e animais, razão pela qual não é considerada uma doença de notificação obrigatória. De incidência e epidemiologia desconhecidas, as escassas informações sobre a evidência sorológica em humanos e animais se restringem aos estados da Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo. Lamas e colaboradores em 2009 ao analisarem amostras de soro de pacientes HIV reativos, atendidos em serviço de saúde na região administrativa de Jacarepaguá, Município do Rio de Janeiro, identificaram quatro pacientes do sexo feminino com anticorpos anti-*C. burnetii* e uma das pacientes referia contato com material de parto de uma cadela (Lamas et al. 2009). Mais recentemente a detecção de anticorpos anti-*C. burnetii* em amostras de casos suspeitos e a análise histopatológica, utilizando a coloração de Gimenez em fragmento tecidual de válvula endocárdica permitiram a detecção de raros casos de febre Q (Brandão et al. 1953, Costa et al. 2006, Lamas et al. 2009, Ribeiro do Valle et al. 1955, Riemann et al. 1974, Siciliano et al. 2008, Travassos et al. 1954).

## 2.5- Diagnóstico Laboratorial

### 2.5.1- Diagnóstico Sorológico

Uma vez que o diagnóstico clínico é difícil, na maioria dos casos, o diagnóstico de febre Q depende dos testes sorológicos. Uma variedade de técnicas sorológicas está disponível, mas o teste de microimunofluorescência indireta tornou-se a técnica de referência (Angelakis & Raoult 2010). O diagnóstico sorológico é fácil de ser estabelecido, embora anticorpos sejam geralmente detectados somente após 2-3 semanas do início da doença. Assim, os testes sorológicos devem ser pareados da fase aguda e da fase convalescente. Além disso, o teste sorológico permite a diferenciação de infecções de febre Q agudas e crônicas (Figura 2.6). Métodos que têm sido usados incluem, além da imunofluorescência indireta (IFA), também a microaglutinação, fixação de complemento, radioimunoensaio, teste de hemólise indireta, ELISA (“Enzyme-linked Immunosorbent Assay”), ELIFA (“Enzyme Linked Immuno Fluorescent Assay”), “dot immunoblotting”, e “Western blotting”. As técnicas mais comumente usadas incluem fixação de complemento, IFA, ELISA e microaglutinação. Apenas os dois primeiros métodos são disponíveis comercialmente (Maurin & Raoult 1999, Fournier et al. 1998).

A IFA continua a ser a técnica de referência para o diagnóstico da febre Q e tem a vantagem de exigir apenas pequenas quantidades de antígeno - *C. burnetii* fase I e fase II com a cepa Nine Mile. A fase II do antígeno é obtida por crescimento de *C. burnetii* em cultura de células, enquanto o antígeno de fase I é obtido a partir de baço de camundongos infectados. Anticorpos IgG, IgM e subclasses de IgA podem ser determinados. A técnica de IFA é melhorada usando um absorvente de fator reumatóide para remover IgG antes da determinação dos títulos de IgM ou IgA. Durante a febre Q aguda, a soroconversão é geralmente detectada 7-15 dias após o início dos sintomas clínicos e os anticorpos são detectados pela terceira semana em cerca de 90% dos casos. Um título de anticorpos IgG anti-fase II  $\geq 200$  e um título de anticorpos IgM anti-fase II  $\geq 50$  são considerados significativos, mas a escolha dos títulos de corte negativos depende da quantidade de estimulação antigênica na população estudada e pode variar de uma área para outra. Febre Q crônica é caracterizada pela presença de anticorpos anti-fase I, e um título de anticorpos de IgG anti-fase I  $\geq 800$  é considerado altamente preditivo de endocardite de febre Q (Maurin & Raoult 1999).

Reações cruzadas são a maior fonte de confusão na interpretação dos resultados sorológicos, e estes podem variar de acordo com a técnica sorológica. Reações cruzadas foram descritas entre *C. burnetii* e qualquer *Legionella pneumophila*, *Legionella micdadei*, *Bartonella quintana* ou *Bartonella henselae*. Tais reações cruzadas devem ser consideradas no diagnóstico etiológico da pneumonia atípica, que pode ser causada tanto por *C. burnetii* quanto por *Legionella* ou da endocardite com hemocultura negativa que pode ser decorrente

tanto de *C. burnetii* quanto por diferentes espécies de *Bartonella*. Um diagnóstico diferencial é facilmente estabelecido quando os títulos de anticorpos quantitativos contra ambos os antígenos de *C. burnetii* anti-fase I e anti-fase II são determinados (Maurin & Raoult 1999).

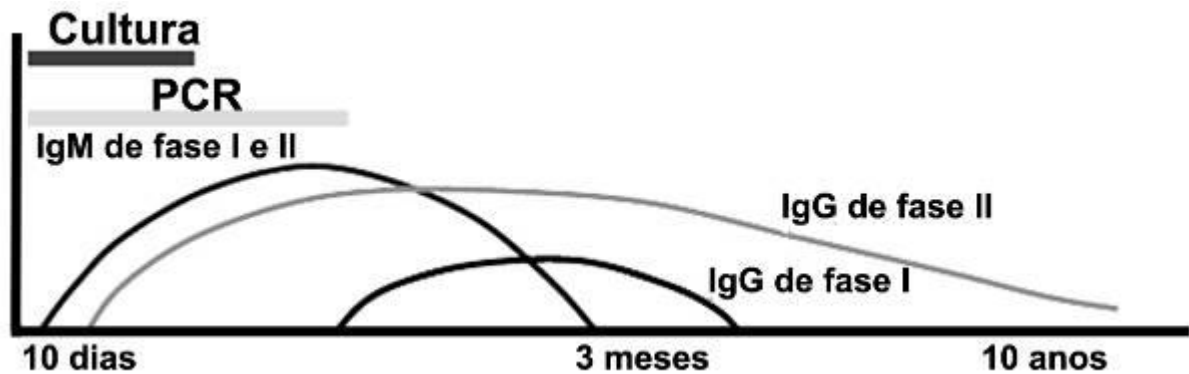


Figura 2.6: Cinética de anticorpos e técnicas de diagnóstico da febre Q aguda (Raoult & Parola 2007).

### 2.5.2- Diagnóstico Molecular

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido usada com sucesso para detectar DNA *C. burnetii* em culturas de células e amostras clínicas (Tabela 2.2). Inicialmente, os métodos utilizavam hibridização específica de sondas de DNA marcadas para ácido nucléico amplificado a partir de amostras clínicas. Estes métodos eram muito sensíveis e específicos, mas estavam disponíveis apenas em laboratórios de pesquisa especializados. A disponibilidade de “primers” derivados de genes específicos para *C. burnetii* tem permitido um método simples e confiável para a detecção desta bactéria, mesmo em tecidos conservados em parafina. Além disso, a PCR tem se mostrado mais sensível do que técnicas de cultura padrão para o diagnóstico retrospectivo, com amostras congeladas e para o acompanhamento dos pacientes tratados para a febre Q crônica. Segundo os autores, as amostras mantidas congeladas a - 80 ° C são adequadas para PCR por vários anos e os “primers” derivados do elemento repetitivo *htpAB* associado são usados rotineiramente com sucesso no laboratório (Fournier et al. 1998). Este elemento existe em pelo menos 19 cópias do genoma Nine Mile I de *C. burnetii* e a PCR com base nesse gene é muito sensível (Willems et al. 1994).

Durante os últimos anos, vários testes diagnósticos baseados em PCR foram desenvolvidos para detectar DNA *C. burnetii* em culturas celulares e em amostras clínicas. Estes ensaios utilizam PCR convencional, nested PCR ou PCR em tempo real feitos em Light-Cycler, SYBR Green ou química TaqMan (Klee et al. 2006). A Light-Cycler Nested PCR (LCN-PCR), um teste rápido de PCR que usa soro como amostra e como termociclador

o Light-Cycler, visando uma multicópia 20-cópia da sequência elemento *htpAB* associado foi adaptado para o diagnóstico tanto de febre Q aguda como crônica. O ensaio de LCN-PCR pode ser útil no estabelecimento de um diagnóstico precoce da febre Q crônica. Devido à sua alta sensibilidade e especificidade, o elemento repetitivo IS 11-11 é o melhor gene-alvo para a detecção de *C. burnetii* em pacientes com febre Q ativa. Recentemente, a sequência completa do genoma de *C. burnetii* se tornou disponível, permitindo uma grande variedade de alvos de DNA (Angelakis & Raoult 2010).

Berri e colaboradores (2000) mostraram a que sensibilidade do Trans-PCR foi 100 vezes maior do que a sensibilidade obtida com PCR usando “primers” CB1-CB2. A sensibilidade também foi testada em amostras de DNA extraído de esfregaços genitais coletados dos animais naturalmente infectados.

Tabela 2.2: Alguns genes e “primers” derivados disponíveis para amplificação por PCR de *C. burnetii* (Fournier et al. 1998).

Gene	“primers” (sequências)
16S rRNA	16S1 (5'-CTC CTG GCG GCG AGA GTG GC-3') 16S2N (5'-GTT AGC TTC GCT ACT AAG AAG GGA ACT TCC C-3')
23S rRNA	976F (5'-AGG TCC TGG TGG AAA GGA ACG-3') 1446R (5'-TCT CAT CTG CCG AAC CCA TTG C-3')
16S-23S rRNA internal transcribed spacer	16SF (5'-TTG TAC ACA CCG CCC GTC A-3') 23SR (5'-GGG TT (CGT) CCC CAT TCG G-3') 16SS (5'-GAA GTC GTA ACA AGG TA-3') 23SS (5'-TCT CGA TGC CAA GGC ATC CAC C-3')
Superoxide dismutase	CB1 (5'-ACT CAA CGC ACT GGA ACG GC-3') CB2 (5'-TAG CTG AAG CCA ATT CGC C-3')
Plasmid QpRS	QpRS01 (5'-CTC GTA CCC AAA GAC TAT GAA TAT ATC-3') QpRS02 (5'-CAC ATT GGG TAT CGT ACT GTC CCT-3')
Plasmid QpH1	QpH11 (5'-TGA CAA ATA GAA TTT CTT CAT TTT GAT-3') QpH12 (5'-GCT TAT TTT CTT CCT CGA ATC TAT GAA T-3')
<i>cbbE</i>	G4131 (5'-CTG ATG TGT CAA GTA ATG TCG G-3') G4132 (5'-CTT CAT GGT TAT GAT TCT GCG-3')
<i>htpAB</i>	Trans1 (5'-TAT GTA TCC ACC GTA GCC AGT C-3') Trans2 (5'-CCC AAC AAC ACC TCC TTA TTC-3')

### 2.5.3- Isolamento Bacteriano

A virulência de *C. burnetii* é alta, razão pela qual apenas laboratórios com biossegurança de nível 3 e profissional experiente devem ser autorizados a manipular amostras clínicas na tentativa de isolamento e cultivo do microorganismo.

Vários espécimes humanos são adequados para a detecção de *C. burnetii*, mas a sua disponibilidade depende da apresentação clínica. Todas as amostras, excluindo sangue total

que deve ser mantido a 4 °C, devem ser armazenadas em - 80 °C e devem ser encaminhadas em gelo seco para o laboratório de diagnóstico (Angelakis & Raoult 2010).

Várias linhagens celulares podem ser usadas para culturas *in vitro*. Fibroblastos humanos de pulmão embrionário (células HEL) cultivadas em frascos de “shell” são usados mais rotineiramente por causa de sua alta susceptibilidade à infecção por *C. burnetii* e fácil manutenção. As monocamadas de células em frascos de “shell” são inoculadas com 1 ml de amostra clínica e centrifugado (700 x g em 20 °C) por 1 h para aumentar a fixação e penetração de *C. burnetii* nas células. Monocamadas inoculadas são incubadas a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub> de 5 a 7 dias. *Coxiella burnetii* é geralmente observada pelo exame microscópico de monocamadas de células após serem submetidas à coloração de Gimenez ou imunofluorescência (Angelakis & Raoult 2010, Maurin & Raoult 1999).

Mais recentemente, com o desenvolvimento das pesquisas no campo da genômica funcional, Omsland e colaboradores (2009) conseguiram, através de um complexo meio nutriente construído a partir da reconstrução genômica, expressão “microarrays” e fingerprinting metabólico, o crescimento de *C. burnetii* em meio axênico. Este fato inédito, além de facilitar os estudos sobre a patogênese e a genética do organismo, possibilitará o isolamento bacteriano no futuro com menor custo e maior facilidade.

#### **2.5.4- Histopatologia Associada com Imunohistoquímica**

A detecção de *C. burnetii* em tecidos é especialmente informativa em pacientes que estão em tratamento para a febre Q crônica. Amostras podem ser testadas a fresco ou após fixação em formol e parafina. Imunodeteção é realizada usando técnicas de imunoperoxidase ou imunofluorescência com anticorpos policlonais ou monoclonais. Apenas esta última técnica pode ser usada em amostras em parafina (Angelakis & Raoult 2010, Maurin & Raoult 1999). Multiplicação intracelular de *C. burnetii* pode explicar porque vegetações da válvula cardíaca são pequenas ou inexistentes nos pacientes com endocardite de febre Q e, portanto, não são na maioria das vezes visualizada pelo ecocardiograma (Maurin & Raoult 1999).

#### **2.6- Infecção**

A principal característica da febre Q é o seu polimorfismo clínico, de modo que o diagnóstico só pode ser realizado por testes sistemáticos. É provável que fatores como a via de infecção e o tamanho do inóculo determinem, no homem, a expressão da infecção por *C. burnetii*. Na verdade, a via respiratória está associada com pneumonia e a via digestiva com hepatite (Angelakis & Raoult 2010), enquanto inóculos elevados estão associados com miocardite (Maurin & Raoult 1999). Sexo e idade também interferem na expressão da

infecção por *C. burnetii*. Homens são frequentemente mais sintomáticos do que as mulheres, apesar da exposição e soroprevalência comparáveis. Além disso, a prevalência de casos clínicos em crianças aumenta significativamente com a idade e febre Q sintomática ocorre mais frequentemente em pessoas com mais de 15 anos (Angelakis & Raoult 2010).

### 2.6.1- Infecção em Humanos

Infecção por *C. burnetii* pode se apresentar com manifestações clínicas agudas ou crônicas. No entanto, quase 60% dos casos de febre Q são assintomáticos. Entre os 40% dos pacientes sintomáticos, a maioria (38% dos 40%) experimentará uma doença leve, sem a necessidade de hospitalização. Pacientes hospitalizados representam apenas 2% dos indivíduos infectados, e apenas 1 em cada 10 dentre eles (0,2% do total) desenvolve a febre Q crônica. Essas proporções correspondem aos dados obtidos a partir de análise dos casos confirmados no sul da França, as incidências de febre Q e a endocardite são, respectivamente, de 50/ 100.000 habitantes e em 1/ milhão de habitantes (Maurin & Raoult 1999).

A febre Q aguda sintomática se manifesta principalmente como uma doença febril autolimitada, pneumonia atípica, ou uma hepatite granulomatosa, enquanto endocardite é a apresentação mais comum de febre Q crônica. No entanto, porque as manifestações clínicas da febre Q são muitas vezes inespecíficas, a doença deve ser sistematicamente considerada em pacientes febris com contato recente com animais parturientes (Maurin & Raoult 1999).

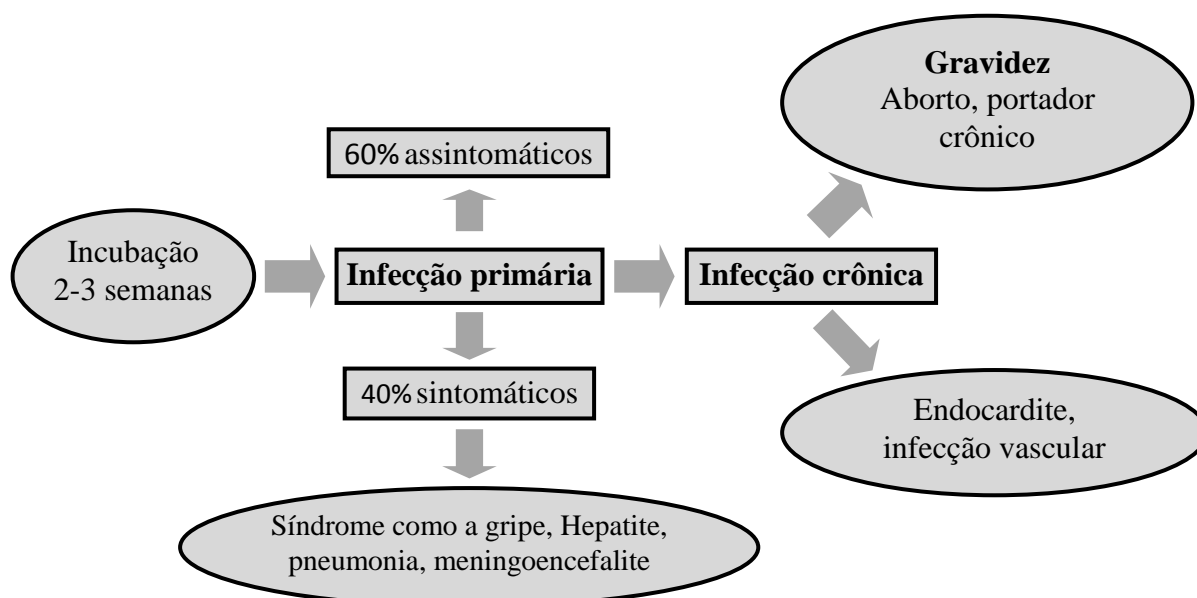


Figura 2.7: História natural da febre Q humana, na ausência de tratamento (Angelakis & Raoult 2010).

### 2.6.1.1- Febre Q Aguda

Apresentação clínica comum, após um período de incubação da febre Q que pode durar 2-3 semanas, dependendo do inóculo de *C. burnetii*. Em pacientes sintomáticos, o início geralmente é abrupto, com febre alta, cansaço, calafrios e dores de cabeça. A manifestação clínica mais frequente da febre Q aguda é provavelmente uma doença febril autolimitada associada com intensa cefaléia. Pneumonia atípica é também uma frequente apresentação clínica e os sintomas clínicos podem variar de pneumonia clinicamente assintomática diagnosticada na radiografia de tórax até insuficiência respiratória aguda, embora esta última continue a ser extremamente rara. A hepatite é outra apresentação frequente da febre Q aguda e é geralmente identificada durante investigação laboratorial de pacientes com quadro hepático com níveis aumentados de aspartato aminotransferase [AST], alanina aminotransferase [ALT] e fosfatase alcalina. Hepatomegalia pode ser clinicamente detectável, mas a icterícia é rara (Maurin & Raoult 1999).

Assim, sucintamente, a infecção por *C. burnetii* pode determinar várias síndromes clínicas agudas como, por exemplo, doença febril autolimitada, pneumonia, hepatite, endocardite, osteomielite, febre Q na infância, manifestações neurológicas, exantema, febre de origem obscura, trombocitopenia ou trombocitose reativa, além das complicações da febre Q aguda (Marrie 1990, Angelakis & Raoult 2010).

### 2.6.1.2- Febre Q Crônica

O diagnóstico da febre Q crônica pode ser estabelecido a partir da persistência da manifestação clínica por mais de 6 meses após o início do quadro clínico. Ocorre em aproximadamente 5% dos pacientes infectados com *C. burnetii* e pode se desenvolver insidiosamente meses a anos após a doença aguda. Na forma crônica da febre Q, *C. burnetii* se multiplica em macrófagos, evento que resulta em coxielemia permanente e consequentemente níveis muito elevados de anticorpos persistentes. Normalmente, o coração é o órgão mais comumente envolvido, seguido por artérias, ossos e fígado. Endocardite ocorre geralmente em pacientes com lesão valvular prévia ou aqueles que estão imunocomprometidos (Fournier et al. 1998).

Endocardite, infecções vasculares, infecções osteoarticulares, hepatite crônica, infecções pulmonares crônicas, síndrome da fadiga crônica, cronicidade favorecida pela gravidez e prematuridade e aborto são algumas das apresentações clínicas que resultam da infecção crônica (Angelakis & Raoult 2010).

### 2.6.2- Infecção em Animais

Em contraste com a febre Q aguda humana, a infecção animal com *C. burnetii* é, na maioria dos casos, de forma surpreendentemente assintomática. Este fato implica na observação de que o termo coxiellose é considerado uma designação mais apropriada do que febre Q animal. Em animais, durante a fase aguda, *C. burnetii* pode ser encontrada no sangue, pulmões, baço e fígado enquanto que durante a fase crônica é apresentado como uma liberação persistente de *C. burnetii* nas fezes e urina (Angelakis & Raoult 2010).

*Coxiella burnetii* é capaz de infectar muitas espécies animais, incluindo mamíferos, aves e artrópodes. Em animais, infecções por *C. burnetii* são geralmente assintomáticas, mas em mamíferos a infecção pode causar abortos e natimortalidade. Nestes animais, os sinais clínicos mais frequentes da infecção por *C. burnetii* podem ser consequentes à pneumonia, aborto, morte e parto de cordeiros, bezerras ou filhotes debilitados. Na maioria dos casos, o aborto ocorre no final da gestação, sem sinais clínicos específicos até que o aborto esteja prestes a acontecer, como observado com brucelose ou clamidiose. Fetos abortados parecem normais, mas placentas infectadas apresentam espessamento fibroso intercotiledonário e exsudatos descoloridos, que não são específicos para febre Q. Uma resposta inflamatória grave pode ser observada no miométrio e no estroma adjacente à área placentomal durante a gestação em cabras. Os trofoblastos aparecem alterados e espumosos, com inclusões bem definidas de *C. burnetii*, também encontradas em células multinucleares. A taxa de aborto pode variar de 3 a 80%, altas taxas de aborto são raramente observadas, exceto em alguns rebanhos caprinos. Muitas vezes, o número de fêmeas que aborta no rebanho pode não ser suficiente para alertar o fazendeiro e os casos clínicos humanos é que revelam muitas vezes a infecção do rebanho. Em bovinos, metrite é frequentemente a única manifestação da doença. Mamíferos infectados (ruminantes, gatos, cães, coelhos, pequenos roedores silvestres, etc.) liberam *C. burnetii* em produtos provenientes do parto, mas também no leite, urina e fezes. Liberação *C. burnetii* no leite é mais frequente e dura mais tempo em vacas e cabras do que em ovelhas. Ovelhas liberam mais e por mais tempo em descargas vaginais do que cabras e podem manter as bactérias em gestações subsequentes (Arricau-Bouvery & Rodolakis 2005). *Coxiella burnetii* também pode ser recuperada a partir do leite por até 32 meses. Cabras liberam *C. burnetii* nas fezes antes e depois do parto e a duração média de excreção é de 20 dias (Angelakis & Raoult 2010).

### 2.7- Profilaxia e Medidas de Prevenção

Um cuidado especial deve ser tomado quando se introduz um novo animal em um rebanho livre de febre Q. Simplesmente garantir que o novo animal não está infectado não é suficiente, pois a febre Q é, principalmente, transmitida no ar. Durante surtos de febre Q, a



contaminação de animais e do meio ambiente podem ser evitados ou reduzidos, destruindo placentas e fetos, de modo a evitar a sua ingestão por carnívoros domésticos ou selvagens, que conseqüentemente podem disseminar a bactéria no ambiente. Se possível, os nascimentos devem ser confinados a uma localização específica e desinfetados sem induzir aerossóis (Rodolakis 2009).

Como em todas as doenças zoonóticas, o controle da doença em animais vai influenciar o nível da doença observada no homem. Estratégias apropriadas de controle de carrapato e boas práticas de higiene podem diminuir a contaminação ambiental. Fluidos e as membranas fetais infectados, fetos abortados e materiais de cama contaminados devem ser incinerados ou enterrados, após desinfecção. Além disso, o estrume deve ser tratado com cal ou cianeto de cálcio 0,4% antes de ser espalhado sobre os campos, o que deve ser feito na ausência de vento para evitar a propagação do microorganismo a longas distâncias. Tratamento com antibióticos pode ser feito para reduzir o número de abortos e a quantidade de liberação de *C. burnetii* no parto. Embora seja muito caro, os animais infectados devem ser retirados dos rebanhos ou colocados em confinamento separados no momento do parto. Trabalhadores da indústria animal devem ser plenamente informados sobre os fatores de risco de contrair febre Q e os laboratórios devem ser dotados de dispositivos de segurança adequados e equipamentos (Angelakis & Raoult 2010).

O tratamento com antibióticos, consistindo de duas injeções de tetraciclina (20 mg / kg) durante o último mês de gestação é frequentemente usado para reduzir o número de abortos e a quantidade de liberação de *C. burnetii* no parto. A eficácia deste tratamento nunca foi avaliada com precisão, mas tem demonstrado que não previne completamente o aborto ou a liberação de *C. burnetii* no parto (Rodolakis 2009).

Pasteurização a 72 °C durante 15 segundos ou esterilização do leite de rebanhos infectados são regularmente recomendado mesmo que a via oral não seja a principal via de transmissão (Arricau-Bouvery & Rodolakis 2005).

Buhariwalla e colaboradores (1996) chamam a atenção para casos de febre Q transmitidos por gatos e cães domésticos e sobre a importância da infecção humana associada com material de aborto ou parto destes animais de companhia.

Três tipos de vacina têm sido propostas para fornecer a proteção humana contra a febre Q: i) a vacina de *C. burnetii* viva atenuada produzida e testada na Rússia, mas posteriormente abandonada devido à preocupação com sua segurança; ii) vacina de resíduo extraído em clorofórmio-metanol ou outras vacinas extraídas (testadas em animais, mas não em seres humanos), e iii) a vacina inativada por formalina de célula inteira (Q-Vax) considerada aceitável e segura para ser utilizada em seres humanos (Angelakis & Raoult 2010). Mas até o momento não temos nenhuma vacina disponível no Brasil.

### 3- JUSTIFICATIVA

A febre Q, uma zoonose cosmopolita e insidiosa causada por *C. burnetii*, é um importante problema de saúde pública em diversos países, em especial na França e, mais recentemente, na Holanda, onde, nos últimos três anos, mais de 3.500 casos foram confirmados. Reconhecida no Brasil pela primeira vez em 1953, apesar da evidência sorológica de sua existência no território brasileiro, sejam pelos estudos realizados em populações consideradas de risco, seja pela presença de anticorpos anti-*C. burnetii* em pacientes HIV sororreativos no Rio de Janeiro ou em um paciente com endocardite hemocultura negativa, pouco se sabe sobre sua incidência e epidemiologia em nosso país. Só recentemente, após identificação no Brasil do primeiro caso confirmado por análise molecular em um paciente com febre de origem obscura residente no Município de Itaboraí, Rio de Janeiro, outros casos têm sido diagnosticados através da recuperação do genoma bacteriano, ratificando a presença do agente em nosso território. Assim, diante do exposto e do cenário mundial, este estudo, além de contribuir para o conhecimento da febre Q no Brasil e de fornecer informações inéditas que possam subsidiar a vigilância desta zoonose no contexto do diagnóstico sintomático febril, poderá servir como ponto de partida para viabilizar a promoção da febre Q como doença de notificação compulsória pelo Ministério da Saúde.

## 4- OBJETIVOS

### 4.1- Objetivo Geral

Investigar, por estudos sorológicos e moleculares, a presença de infecção por *Coxiella burnetii* em amostras de seres humanos, vertebrados e artrópodes, em área de ocorrência de caso confirmado de febre Q no Município de Itaboraí, Estado do Rio de Janeiro

### 4.2- Objetivos Específicos

- Realizar análise sorológica, utilizando teste de imunofluorescência indireta, em amostras de soro de população humana contatante e de animais;
- Realizar análise molecular, através da reação em cadeia da polimerase, utilizando protocolos previamente estabelecidos no Laboratório de Hantavirose e Rickettsioses, em amostras de sangue de população humana e de animais vertebrados;
- Pesquisar o genoma de *Coxiella burnetii* em amostras de leite, secreção vaginal, swab anal e fezes dos pequenos animais ruminantes;
- Identificar taxonomicamente os artrópodes coletados em animais incluídos no estudo;
- Verificar a presença de infecção por *C. burnetii* em artrópodes (carrapatos e pulgas) coletados de vertebrados incluídos no estudo;
- Caracterizar as sequências genômicas identificadas em amostras biológicas de animais incluídos no estudo;
- Contribuir na alimentação do banco de dados contendo as sequências nucleotídicas das diferentes proteobactérias – “rickettsias lato sensu” – do Laboratório de Referência Nacional para Rickettsioses do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz;
- Disponibilizar informações obtidas no estudo para a vigilância epidemiológica municipal e estadual visando à instituição de medidas de prevenção.

## 5 – MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1– Desenho de Estudo

Para este estudo foi proposto um desenho epidemiológico descritivo seccional, em duas etapas conforme o local de coleta das amostras, para verificar a presença de *C. burnetii*, em amostras de seres humanos, vertebrados e artrópodes, em área de ocorrência de caso confirmado.

### 5.2– Considerações Éticas

Este estudo faz parte do projeto sobre vigilância das rickettsioses com ênfase na febre Q no Município de Itaboraí e que obteve, para o estudo com população humana, aprovação pela Comissão de Ética Institucional (CEP/Fiocruz) sob o número 552/10. As amostras de animais domésticos foram coletadas, após a assinatura do consentimento livre e esclarecido pelo proprietário, no contexto da vigilância em saúde pelo Laboratório de Referência Nacional para Rickettsioses, com o apoio das Secretarias Municipal de Itaboraí e Estadual do Rio de Janeiro.

### 5.3- Estudo da Área e Divisão de Etapas

Itaboraí é um município brasileiro do estado do Rio de Janeiro na região metropolitana (Figura 5.1). Localiza-se a 22°44'51" de latitude sul e 42°51'21" de longitude oeste, a 17 m em relação ao nível do mar e dista 40 km da capital (Rio de Janeiro) (Prefeitura Municipal de Itaboraí 2010). A população estimada para 2009 foi de 228.996 habitantes (IBGE 2010). A vegetação do município é composta em maior parte por pastagens, mata de encosta, mangues e brejos. Os remanescentes de matas, observados nos setores mais íngremes e elevados nas Serras do Barbosão e do Lagarto, são tipicamente secundárias resultantes da regeneração natural, pois concentraram muita exploração de madeira para a obtenção de carvão e lenha no passado.

No restante do município, as matas encontram-se muito fragmentadas e aparecem em locais isolados. As maiores altitudes da cidade são encontradas na Serra do Barbosão e a leste na divisa com Tanguá, e nas Serras do Lagarto e Cassorotiba do Sul, na divisa com o município de Maricá. Nas demais localidades, no Norte e Oeste do município, predominam as planícies, onde estão concentrados os rios que convergem para a Baía de Guanabara. Entre as planícies e as serras, observa-se um relevo suavemente ondulado, com morros que raramente ultrapassam os 50 metros (Prefeitura Municipal de Itaboraí 2010).

O estudo realizado foi uma investigação epidemiológica realizada com o apoio das secretarias estadual do Rio de Janeiro e municipal de Itaboraí. Duas etapas no projeto foram

estabelecidas: uma primeira etapa na qual as amostras biológicas de familiares do paciente e de animais domésticos residentes na propriedade foram coletadas em 2008 e uma segunda etapa, em 2009, quando moradores residentes na propriedade para onde foram transferidas as cabras, prováveis fontes de infecção de *C. burnetii* foram incluídos no estudo.

As características fisiográficas das duas localidades incluídas no estudo são semelhantes. Situam-se em uma região periurbana de planícies com pastagens e rodeadas por um entorno similar. Importante salientar que esta área situa-se no Município de Itaboraí, no qual a implantação do Complexo Petroquímico da Petrobrás tem determinado o desmatamento e ocupação de vastas áreas, assim como, a migração de população de diferentes regiões do Brasil. Esta informação constitui um importante determinante para a realização e aprofundamento deste desenho de estudo.



Figura 5.1: Município de Itaboraí na região metropolitana do estado do Rio de Janeiro local onde surgiu o foco da infecção.

## 5.4 - Detalhamento da Coleta de Amostras

### 5.4.1 - Etapas de Trabalho de Campo

Na primeira etapa, dentro do contexto da vigilância epidemiológica das rickettsioses, coordenada pelo Laboratório de Referência Nacional para Rickettsioses, com a colaboração do serviço de saúde do Município de Itaboraí, a investigação do caso foi realizada na propriedade do paciente, com equipamento individual de biossegurança (EPI) cumprindo os procedimentos preconizados pelo manual de biossegurança da Fundação Oswaldo Cruz, em 03 de dezembro de 2008 (Figura 5.2).



Figura 5.2: Febre Q no Município de Itaboraí, Rio de Janeiro. Propriedade do paciente, no local onde foi indentificado o foco da infecção.

Amostras de sangue periférico tanto de humanos como de animais, após assinatura do consentimento livre e esclarecido, foram coletadas por membros da equipe do Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses. A coleta de sangue de familiares do paciente foi feita por uma biomédica e a de animais foi realizado pela autora deste projeto de dissertação de mestrado, a médica veterinária responsável pelos procedimentos nos animais domésticos. Foi coletada a terceira amostra de sangue do paciente que já se encontrava de alta hospitalar em casa, além de amostras de sua esposa e filha, e da coleta de sangue de 13 caninos sem raça definida e três ovelhas.



Figura 5.3: Febre Q no Município de Itaboraí, Rio de Janeiro. Coleta de material de animais na propriedade do paciente, no local onde foi indentificado o foco da infecção.



O método de coleta das amostras sanguíneas dos animais domésticos (Figura 5.3) consistiu de veno-punção em veia cefálica ou por veno-punção em veia jugular após assepsia com solução de álcool-iodado. O sangue foi colhido com seringa descartável de 5 ml com agulha (25 x 0,7mm) e acondicionado e refrigerado até ser centrifugado em tubo BD Vacutainer® sem anticoagulante. Foi dividido em duas amostras, soro e coágulo (para sorologia e análise molecular) mantidas a -20 °C para posterior análise.

Na segunda etapa, realizada na residência para onde foi vendido o lote de cabras em 27 de março de 2009 (Figura 5.4), o método de coleta foi desenvolvido com a utilização de equipamentos de proteção individual, com aparelhos para filtragem de ar com filtros HEPA, associados à máscara de pressão positiva além do uso de aventais descartáveis, botas de borracha, luvas cirúrgicas. Antes do início das coletas foi feita a limpeza umedecendo piso e paredes com os desinfetantes recomendados como Lysol a 10% para evitar a formação de aerossóis devido a possibilidade de inalação dos produtos da esporogênese característica deste organismo. O mesmo procedimento foi realizado no local onde se encontrava o aprisco com fezes e urina das cabras.



Figura 5.4: Febre Q no Município de Itaboraí, Rio de Janeiro. Local da segunda etapa, realizada na residência para onde foi vendido o lote de cabras no município de Itaboraí.

Depois da preparação da área, os animais foram submetidos a coleta de amostras sanguíneas por veno-punção em veia jugular após assepsia com solução de álcool-iodado. Seringas de 5 ml com agulhas (25 x 0,7mm) descartáveis foram utilizadas e as amostras de sangue coletadas foram acondicionadas e refrigeradas até centrifugação em tubo BD Vacutainer® sem anticoagulante. Foram divididas em duas amostras soro e coágulo (para sorologia e análise molecular) e mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise. Um cão, um felino, dois equinos e sete cabras adultas, uma cabrita, uma cabra prenhe e um bode foram incluídos neste estudo. Adicionalmente, amostras de leite, além de swab vaginal e anal das cabras adultas foram coletadas e assim como a secreção nasal de um bode. Por fim, visando obter o maior número de amostras biológicas, foram coletadas amostras de fezes de dentro do aprisco, embaixo do aprisco, ao lado do aprisco, em uma área exposta ao sol e de dentro do aprisco onde estava abrigada a cabra prenhe. Das quatro pessoas residentes no local, as amostras foram coletadas pela médica infectologista orientadora deste projeto. Todas as amostras biológicas humanas e de animais foram acondicionadas e refrigeradas e as amostras de sangue, após a centrifugação, foram também acondicionadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para a análise sorológica (soro) e coágulo para a análise molecular (Figura 5.5).



Figura 5.5: Febre Q no Município de Itaboraí, Rio de Janeiro. Método de coleta de material de animais, com a utilização de equipamentos de proteção individual para filtragem de ar com filtros HEPA.



As amostras de sangue tanto dos indivíduos contatantes e de animais, quanto amostras de leite, secreção vaginal, nasal e retal, além das fezes e dos artrópodes coletados nos animais, contabilizando um total de 154 amostras, foram encaminhados e acondicionados no Laboratório de Hantaviroses e Rickettsioses.

## 5.5- Metodologia Laboratorial

### 5.5.1- Teste sorológico

A detecção de anticorpos da classe IgG anti-*C. burnetii* foi realizada pelo teste de imunofluorescência indireta (IFA), seguindo o ponto de corte estabelecido pelo fabricante PANBIO/MEDVAX®, com os valores de corte de titulação superior ou igual a 64. As lâminas de IFA para febre Q contêm organismos purificados nas fases I e II distribuídos em dois microcírculos dispostos lado a lado dentro do poço da lâmina (Figura 5.6).

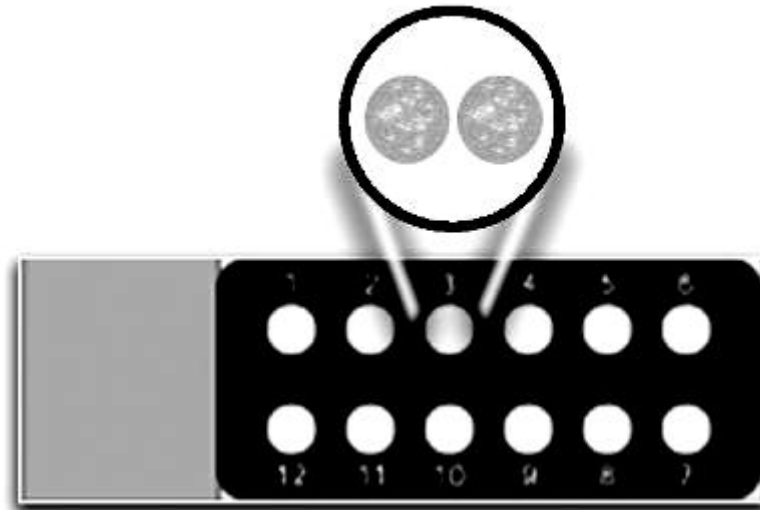


Figura 5.6: Figura esquemática da lâmina para teste de imunofluorescência indireta para febre Q com dois microcírculos dentro do poço contendo antígenos da fase II (microcírculo do lado esquerdo) e da fase I (microcírculo do lado direito) na visualização do microscópio.

O procedimento para a detecção qualitativa e quantitativa de anticorpos IgG humanos e de animais contra *C. burnetii* em amostras de soro, foi feita, preferencialmente, com uma triagem selecionando amostras reativas com os títulos de 64, a partir da diluição inicial de 1:16 com PBS de diluição de soro ( $\text{pH } 7,2 \pm 0,2$ ). Adicionou-se 30 $\mu\text{l}$  da amostra diluída 1:64 no orifício da lâmina onde estão presentes as células fixadas contendo *C. burnetii* fase I e fase II e os controles positivos e negativos. Após incubação da lâmina em câmara úmida em estufa à temperatura aproximada de 37 °C por 30 minutos, em um segundo estágio, adicionou-se sobre os orifícios da lâmina após lavagem com PBS de lavagem ( $\text{pH } 9,0 \pm 0,2$ ), anticorpo

IgG anti-humano (ou de animais) conjugado à FITC. A lâmina foi incubada novamente, e posteriormente, após lavagem e aplicação de glicerina (pH  $9,7 \pm 0,2$ ) para montagem da lamínula, foi analisada em microscópio de fluorescência em um aumento de 400x. Na presença de anticorpos IgG na amostra testada, as reações foram consideradas reativas e apareceram como uma coloração verde-maçã fluorescente. Os títulos finais foram estabelecidos com diluições seriadas do soro em pesquisa, determinando o aparecimento de fluorescência, chamado de quantificação (“end-point”) e foi definida como a maior titulação na qual ainda se detectou reatividade nas amostras testadas.

### 5.5.2- Análise molecular

Quanto à análise molecular, as amostras de sangue e do triturado dos artrópodes foram testadas para a presença de DNA bacteriano, utilizando oligonucleotídeos descritos por Hoover e colaboradores (1992) e Willems e colaboradores (1994) (Quadro 5.1) para o gene alvo *htpAB*, derivados de uma região transposon-like repetitiva do genoma *C. burnetii*.

Quadro 5.1: Oligonucleotídeos (“primers”) utilizados para detecção de *Coxiella burnetii*.

Oligonucleotídeos	Sequências (5' – 3')	Temperatura anelamento	Tamanho do fragmento
QBT-1	TATGTATCCACCGTAGCCAGTC	60 °C	687bp
QBT-2	CCCAACAACACCTCCTTATTC		

#### 5.5.2.1- Extração de DNA

As amostras coletadas de swabs vaginais, leite e as fezes foram submetidas à análise molecular utilizando kit comercial (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen®) para extração de DNA de acordo com as instruções do fabricante para purificação de tecido e foram preparados para a extração conforme descrito anteriormente (Astobiza et al. 2010, Guatteo et al. 2007, Rodolakis et al. 2007). Resumidamente, swabs vaginais e anais foram extensivamente lavados em 1 mL de PBS e 200 µL desta solução foi misturada com ATL (QIAamp kit DNA do sangue, Qiagen) e digerido com proteinase K (8mg/mL) incubado por 56°C em banho-maria overnight e adicionado AL (QIAamp kit DNA do sangue, Qiagen) por 10 min a 70 °C. Cada amostra de leite (200 µL) foi misturada diretamente com o ATL e proteinase K e incubada a 56 °C em banho-maria overnight, e adicionado AL por 10 min a 70 °C. Para as amostras de fezes foi utilizada metodologia sugerida pela Dra. Eliane Veiga da Costa (Laboratório de Enterovírus/IOC) na qual 2g de fezes foram misturadas com 10 ml PBS

e 1 ml de clorofórmio em tubo falcon de 15 ml com pérolas autoclavadas no fundo. Esta mistura foi vortexada durante 30 minutos e depois centrifugada a 3.390 x g por 25 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado para a extração com a separação de 200 µL que foram tratados com proteinase K e tampão ATL por 30 min a 70 °C e adicionado AL por 10 min a 70 °C. O processo de extração foi mantido usando kit comercial (QIAamp DNA, Qiagen), conforme informação do fabricante.

#### **5.5.2.2- Procedimento de PCR Convencional**

Amplificação por PCR foi realizada em um volume de 25µl de reação que continha 1x de Tampão PCR 10 x, 6 pmol de cada “primer” (IDT/Prodimol, Belo Horizonte, MG, Brasil), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM mistura de dNTP (20mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato), 0,1U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 4 µL de DNA da amostra e água livre de nuclease (Promega, Madison, WI, EUA).

A amplificação foi realizada em um termociclador 9700 (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA) e consistiu de desnaturação inicial por 5 min a 95°C, seguida de 40 ciclos consecutivos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento a 60°C por 30s e extensão a 72°C durante 1 min. Foi seguido por uma extensão final de 7 min a 72°C.

Para confirmar a amplificação, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com solução de GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA). Foi usado como marcador de peso molecular 100bp-DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e os produtos amplificados foram visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta, foram registrados em sistema digital para documentação de gel (Carestream GelLogic System).

#### **5.5.2.3- Procedimento de sequenciamento e análise filogenética**

O sequenciamento dos produtos de PCR amplificados procedentes de amostras biológicas foi realizado através de purificação usando o Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) de acordo com as instruções do fabricante, seguido de reação de sequenciamento. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando kit BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e os produtos sequenciados foram então purificados com kit BigDye® X-Terminator Purification (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e executados em ABI PRISM 3100 Nucleic Acid Sequence Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A análise das sequências foi conduzida usando os programas BioEdit (Hall 1999) e a versão MEGA 5 (Tamura et al. 2011) e, após o alinhamento de sequência, a caracterização de *C. burnetii* foi realizada comparando as sequências de fragmentos correspondentes depositados no GenBank.

#### 5.5.2.4- Procedimento de PCR Nested

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade e especificidade da reação em cadeia da polimerase (PCR) para pesquisa de *C. burnetii*, uma segunda reação (“nested”) foi realizada utilizando um segundo par de “primers”, especificamente desenhado pelo Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses, a partir dos “primers” utilizados nos protocolos previamente estabelecidos (QBT-1/QBT-2) (Quadro 5.2).

Quadro 5.2: Oligonucleotídeos (“primers” internos) utilizados para detecção de *Coxiella burnetii* na segunda reação de PCR.

Oligonucleotídeos	Sequências (5' – 3')	Temperatura anelamento	Tamanho do fragmento
QBT N3+	AAGCGTGTGGAGGAGCGAACC	66 °C	440bp
QBT N4-	CTCGTAATCACCAATCGCTTCGTC		

Foram utilizados os produtos da primeira PCR de controle positivo, de uma amostra positiva e de uma segunda amostra cuja amplificação do material genômico culminou em uma banda muito fraca que, apesar da repetição do teste, não foi, na ocasião, novamente obtida. Estes produtos foram submetidos a uma PCR de gradiente para selecionar as condições térmicas ótimas da reação.

A amplificação por PCR de gradiente foi realizada em um volume de 25µl de reação, que continha 1x de Tampão PCR 10 vezes, 6 pmol de cada “primer” (Invitrogen, Life Technologies Brazil), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM mistura de dNTP (20mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato), 0,5 unidade de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 2 µL de DNA da amostra e água nuclease livre (Promega, Madison, WI, EUA).

A amplificação foi realizada em um termociclador (Applied Biosystem Veriti 96) e consistiu de desnaturação inicial por 5 min a 95° C, seguida de 30 ciclos consecutivos de desnaturação a 95° C por 30s, anelamento em um gradiente de 65° C / 66° C / 67° C / 68° C / 69° C / 70° C por 30s e extensão a 72° C durante 1 min. Foi seguido por uma extensão final de 5 min a 72° C. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose para selecionar a temperatura de anelamento. Assim, a reação selecionada foi a de desnaturação inicial por 5 min a 95° C, seguida de 30 ciclos consecutivos de desnaturação a 95° C por 30s, anelamento a 66° C por 30s e extensão a 72° C por 30s, sendo seguida por uma extensão final a 72° C por 5 min.

### 5.5.3- Análise dos artrópodes

Os artrópodes coletados, em especial os carrapatos, durante a manipulação dos animais incluídos no estudo, tanto na primeira quanto a segunda etapa, foram acondicionados em frascos de plástico sem conservantes em freezer  $-70^{\circ}\text{C}$ . Todos os artrópodes, após terem sido submetidos à caracterização taxonômica com o apoio do Dr Jairo Dias Barreira, a partir da utilização da chave para a fauna ixodológica brasileira, foram submetidos à limpeza externa e criopreservação, para posterior análise molecular para pesquisa de *C. burnetii*. A desinfecção da superfície externa das amostras foi feita em microtubos de 1,5 ml colocados em plataforma agitadora (Termomix em temperatura ambiente) com 500  $\mu\text{l}$  de hipoclorito de sódio a 10% e agitados por 5 minutos. Toda a solução de hipoclorito de sódio foi retirada com a adição de 1 ml de etanol a 70% nas amostras que foram submetidas à agitação por 5 min. Subsequentemente toda a solução de etanol foi retirada 1 ml de água destilada estéril foi adicionada às amostras que foram novamente agitadas por 5 minutos. Foi retirada toda a água destilada e repetida a lavagem com água por duas vezes. Os tubos contendo as amostras foram centrifugados rapidamente para retirada de toda a água e conservados até a preparação para extração. Posteriormente as amostras foram separadas individualmente trituradas com auxílio de um pilão. Adicionou-se ao ectoparasita, depois de triturado, 180 $\mu\text{l}$  de tampão ATL e 20  $\mu\text{l}$  de proteinase K misturadas no vortex com posterior incubação a  $56^{\circ}\text{C}$  no banho-maria overnight. No dia seguinte foram adicionados 200  $\mu\text{l}$  de tampão AL seguindo uma etapa de incubação a  $70^{\circ}\text{C}$  em termobloco por 10 minutos. O processo de extração foi mantido usando kit comercial (QIAamp DNA, Qiagen), conforme informação do fabricante. Depois de extraído o DNA, as amostras foram divididas em pools para análise molecular.

## 6- RESULTADOS

A partir da análise de amostras de soro, coágulo, leite, pulgas, carrapatos, fezes, secreções vaginais, anais e nasais coletadas nas duas etapas do projeto, correspondendo a um total de 154 amostras, foram obtidos os resultados que, são apresentados, sequencialmente, nas tabelas enumeradas a seguir.

Tabela 6.1: Análise sorológica e molecular em amostras de sangue coletadas de caso suspeito de febre Q e de familiares no Município de Itaboraí, RJ.

Registro	Data de Coleta	PACIENTE	Espécie	Material	Sexo	Idade	Sorologia IFA	PCR
							COX IgG	
LR 862/08	03/11/08	Caso confirmado	humana	soro	M	47a	R = 1:1024	N
LR 863/08	03/11/08	Caso confirmado	humana	coágulo	M	47a	---	P
LR 034/09	03/12/08	Esposa e manipuladora do leite	humana	soro	F	48a	R = 1:128	N
LR 035/09	03/12/08	Esposa e manipuladora do leite	humana	coágulo	F	48a	---	N
LR 036/09	03/12/08	Filha do paciente	humana	soro	F	21a	NR < 1:64	N
LR 037/09	03/12/08	Filha do paciente	humana	coágulo	F	21a	---	N

R – reativo; NR – não reativo; P – positivo; N – negativo.

Tabela 6.2: Análise sorológica e molecular em amostras de sangue coletadas de animais da residência do caso confirmado de febre Q no Município de Itaboraí, RJ.

Registro	Data de Coleta	ANIMAL	Espécie	Material	Sexo	Idade	Sorologia IFA	PCR
							COX IgG	
LR 096/09	03/12/08	Ovelha 1 / mãe do filhote	Ovino	soro	F	---	R = 1:64	N
LR 097/09	03/12/08	Ovelha 1 / mãe do filhote	Ovino	coágulo	F	---	---	N
LR 098/09	03/12/08	Ovelha 2 / filhote	Ovino	soro	F	---	NR < 1:64	N
LR 099/09	03/12/08	Ovelha 2 / filhote	Ovino	coágulo	F	---	---	N
LR 100/09	03/12/08	Ovelha 3 / outra sem brinco	Ovino	soro	F	---	R = 1:64	N
LR 101/09	03/12/08	Ovelha 3 / outra sem brinco	Ovino	coágulo	F	---	---	N
LR 102/09	03/12/08	cão 1 / Docinho	Canino	soro	F	15a	NR < 1:64	N
LR 103/09	03/12/08	cão 1 / Docinho	Canino	coágulo	F	15a	---	N
LR 104/09	03/12/08	cão 2 / Pite	Canino	soro	F	4a	NR < 1:64	NT/SA
LR 105/09	03/12/08	cão 2 / Pite	Canino	coágulo	F	4a	---	N
LR 106/09	03/12/08	cão 3 / Peter	Canino	soro	M	4a	NR < 1:64	N
LR 107/09	03/12/08	cão 3 / Peter	Canino	coágulo	M	4a	---	N
LR 108/09	03/12/08	cão 4 / Princesa	Canino	soro	F	3a	NR < 1:64	NT/SA
LR 109/09	03/12/08	cão 4 / Princesa	Canino	coágulo	F	3a	---	N
LR 110/09	03/12/08	cão 5 / Pitoca	Canino	soro	F	7a	NR < 1:64	N
LR 111/09	03/12/08	cão 5 / Pitoca	Canino	coágulo	F	7a	---	N
LR 112/09	03/12/08	cão 6 / Pitoco	Canino	soro	M	8a	NR < 1:64	N
LR 113/09	03/12/08	cão 6 / Pitoco	Canino	coágulo	M	8a	---	N
LR 114/09	03/12/08	cão 7 / Pequena	Canino	soro	F	2a	NR < 1:64	N
LR 115/09	03/12/08	cão 7 / Pequena	Canino	coágulo	F	2a	---	N
LR 116/09	03/12/08	cão 8 / Chupa cabra	Canino	soro	F	5a	R = 1:64	N
LR 117/09	03/12/08	cão 8 / Chupa cabra	Canino	coágulo	F	5a	---	N
LR 118/09	03/12/08	cão 9 / Pitica	Canino	soro	F	5a	NR < 1:64	N
LR 119/09	03/12/08	cão 9 / Pitica	Canino	coágulo	F	5a	---	N
LR 120/09	03/12/08	cão 10 / Cocada	Canino	soro	F	4a	NR < 1:64	P/S
LR 121/09	03/12/08	cão 10 / Cocada	Canino	coágulo	F	4a	---	N
LR 122/09	03/12/08	cão 11 / Nete	Canino	soro	F	5a	NR < 1:64	N
LR 123/09	03/12/08	cão 11 / Nete	Canino	coágulo	F	5a	---	N
LR 124/09	03/12/08	cão 12 / Toquinho	Canino	soro	M	10a	NR < 1:64	P/S
LR 125/09	03/12/08	cão 12 / Toquinho	Canino	coágulo	M	10a	---	N
LR 126/09	03/12/08	cão 13 / Gustavo	Canino	soro	M	9a	R = 1:64	N
LR 127/09	03/12/08	cão 13 / Gustavo	Canino	coágulo	M	9a	---	N

R – reativo; NR – não reativo; P – positivo; N – negativo; NT/SA – não testado por não ter amostra; P/S – positivo e sequenciado.

Tabela 6.3: Identificação taxonômica e análise molecular de artrópodes coletados de animais da residência do caso confirmado de febre Q no Município de Itaboraí, RJ.

Amostra	Data de Coleta	Espécie		Pool PCR	PCR
Amostra C-02 – 1	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>	Tubo 1	Nº 12 - FP	NT
Amostra C-02 – 2	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>			NT
Amostra C-02 – 3	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>			NT
Amostra C-02 – 4	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>			NT
Amostra C-02 – 5	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>	Tubo 2		NT
Amostra C-02 – 6	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>			NT
Amostra C-02 – 7	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>			NT
Amostra C-02 – 8	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>			NT
Amostra C-03 – 1	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>	Tubo 1		NT
Amostra C-03 – 2	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>			NT
Amostra C-03 – 3	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>			NT
Amostra C-05 – 1	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>	Tubo 1		NT
Amostra C-07 – 1	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>	Tubo 1	Nº 13 - P	NT
Amostra C-07 – 2	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>			NT
Amostra C-07 – 3	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>			NT
Amostra C-07 – 4	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>	Tubo 2		NT
Amostra C-07 – 5	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>			NT
Amostra C-07 – 6	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>			NT
Amostra C-08 – 1	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>	Tubo 1		NT
Amostra C-08 – 2	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>			NT
Amostra C-08 – 3	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>			NT
Amostra C-08 – 4	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>			NT
Amostra C-08 – 5	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>	Tubo 2		NT
Amostra C-08 – 6	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>			NT
Amostra C-08 – 7	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>		NT	
Amostra C-06 – 1	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>	Tubo 1	Nº 14 - N	NT
Amostra C-06 – 2	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>			NT
Amostra C-11 – 1	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>	Tubo 1		NT
Amostra C-12 – 1	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>	Tubo 1		NT
Amostra C-12 – 2	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>			NT
Amostra C-12 – 3	03/12/08	<i>Ctenocephalides felis</i>			NT

P – positivo; N – negativo; FP – fracamente positivo; NT – não testado.

Tabela 6.4: Análise sorológica e molecular em amostras de sangue coletadas de moradores da propriedade que mantinha as cabras que foram vendidas pelo caso índice de febre Q, no Município de Itaboraí, RJ.

Registro	Data de Coleta	PACIENTE	Espécie	Material	Sexo	Idade	Sorologia IFA	PCR
							COX IgG	
LR 583/09	27/03/09	Tratador dos caprinos	humana	soro	M	59 a	NR < 1:64	N
LR 584/09	27/03/09	Tratador dos caprinos	humana	coágulo	M	59a	---	N
LR 585/09	27/03/09	Esposa do tratador dos caprinos	humana	soro	F	54 a	NR < 1:64	N
LR 586/09	27/03/09	Esposa do tratador dos caprinos	humana	coágulo	F	54a	---	N
LR 587/09	27/03/09	Filha do tratador dos caprinos	humana	soro	F	14 a	NR < 1:64	N
LR 588/09	27/03/09	Filha do tratador dos caprinos	humana	coágulo	F	14 a	---	N
LR 589/09	27/03/09	Filho do tratador dos caprinos	humana	soro	M	29a	NR < 1:64	N
LR 590/09	27/03/09	Filho do tratador dos caprinos	humana	coágulo	M	29a	---	N

R – reativo; NR – não reativo; P – positivo; N – negativo.

Tabela 6.5: Análise sorológica e molecular em amostras de sangue coletadas de animais da propriedade que mantinha as cabras que foram vendidas pelo caso índice de febre Q, no Município de Itaboraí, RJ.

Registro	Data de Coleta	ANIMAL	Espécie	Material	Sexo	Idade	Sorologia IFA	PCR
							COX IgG	
LR 591/09	27/03/09	Canino macho SRD	Canino	soro	M	---	NR < 1:64	N
LR 592/09	27/03/09	Canino macho SRD	Canino	coágulo	M	---	---	N
LR 593/09	27/03/09	Cabra adulta 1	Caprino	soro	F	---	R = 1:64	N
LR 594/09	27/03/09	Cabra adulta 1	Caprino	coágulo	F	---	---	N
LR 595/09	27/03/09	Cabra adulta 1	Caprino	leite	F	---	---	P/S
LR 596/09	27/03/09	Cabra adulta 1	Caprino	swab vaginal	F	---	---	N
LR 597/09	27/03/09	Cabra adulta 1	Caprino	swab anal	F	---	---	N
LR 598/09	27/03/09	Cabra adulta 2	Caprino	soro	F	---	NR < 1:64	N
LR 599/09	27/03/09	Cabra adulta 2	Caprino	coágulo	F	---	---	N
LR 600/09	27/03/09	Cabra adulta 2	Caprino	leite	F	---	---	P/S
LR 601/09	27/03/09	Cabra adulta 2	Caprino	swab vaginal	F	---	---	N
LR 602/09	27/03/09	Cabra adulta 2	Caprino	swab anal	F	---	---	P
LR 603/09	27/03/09	Cabra adulta 3	Caprino	soro	F	---	R = 1:64	N
LR 604/09	27/03/09	Cabra adulta 3	Caprino	coágulo	F	---	---	N
LR 605/09	27/03/09	Cabra adulta 3	Caprino	leite	F	---	---	P/S
LR 606/09	27/03/09	Cabra adulta 3	Caprino	swab vaginal	F	---	---	N
LR 607/09	27/03/09	Cabra adulta 3	Caprino	swab anal	F	---	---	N
LR 608/09	27/03/09	Cabra adulta 4	Caprino	soro	F	---	R > 1:64	N
LR 609/09	27/03/09	Cabra adulta 4	Caprino	coágulo	F	---	---	N
LR 610/09	27/03/09	Cabra adulta 4	Caprino	leite	F	---	---	N
LR 611/09	27/03/09	Cabra adulta 4	Caprino	swab vaginal	F	---	---	N
LR 612/09	27/03/09	Cabra adulta 5	Caprino	soro	F	---	R = 1:64	N
LR 613/09	27/03/09	Cabra adulta 5	Caprino	coágulo	F	---	---	N
LR 614/09	27/03/09	Cabra adulta 5	Caprino	leite	F	---	---	P/S
LR 615/09	27/03/09	Cabra adulta 5	Caprino	swab vaginal	F	---	---	N
LR 616/09	27/03/09	Cabra adulta 6	Caprino	soro	F	---	NR < 1:64	N
LR 617/09	27/03/09	Cabra adulta 6	Caprino	coágulo	F	---	---	N
LR 618/09	27/03/09	Cabra adulta 6	Caprino	leite	F	---	---	P/S
LR 619/09	27/03/09	Cabra adulta 6	Caprino	swab vaginal	F	---	---	N
LR 620/09	27/03/09	Cabra adulta 7	Caprino	soro	F	---	R = 1:64	N
LR 621/09	27/03/09	Cabra adulta 7	Caprino	coágulo	F	---	---	N
LR 622/09	27/03/09	Cabra adulta 7	Caprino	leite	F	---	---	P/S
LR 623/09	27/03/09	Cabra adulta 7	Caprino	swab vaginal	F	---	---	N
LR 624/09	27/03/09	Cabra adulta 7	Caprino	secreção nasal	F	---	---	N
LR 625/09	27/03/09	Cabrita (filhote)	Caprino	soro	F	---	NR < 1:64	N
LR 626/09	27/03/09	Cabrita (filhote)	Caprino	coágulo	F	---	---	N
LR 627/09	27/03/09	Cabra prenhe	Caprino	soro	F	---	NR < 1:64	N
LR 628/09	27/03/09	Cabra prenhe	Caprino	coágulo	F	---	---	N
LR 629/09	27/03/09	Cabra prenhe	Caprino	swab vaginal	F	---	---	N
LR 630/09	27/03/09	Bode	Caprino	soro	M	---	NR < 1:64	N
LR 631/09	27/03/09	Bode	Caprino	coágulo	M	---	---	N
LR 632/09	27/03/09	Bode	Caprino	secreção nasal	M	---	---	N
LR 637/09	27/03/09	Gato 1	Felino	soro	---	---	NR < 1:64	N
LR 638/09	27/03/09	Gato 1	Felino	coágulo	---	---	---	N
LR 639/09	27/03/09	Equino Pata branca	Equino	soro	---	---	NR < 1:64	N
LR 640/09	27/03/09	Equino Pata branca	Equino	coágulo	---	---	---	N
LR 641/09	27/03/09	Equino Estrela	Equino	soro	---	---	NR < 1:64	N
LR 642/09	27/03/09	Equino Estrela	Equino	coágulo	---	---	---	N

R – reativo; NR – não reativo; P – positivo; N – negativo; P/S – positivo e sequenciado.



Tabela 6.6: Identificação taxonômica e análise molecular em amostras dos artrópodes coletados de animais da propriedade que mantinha as cabras que foram vendidas pelo caso índice de febre Q, no Município de Itaboraí, RJ.

Registro banco de artrópodes	Data de Coleta	Espécie	Estagio	Sexo	coletado	Pool PCR	PCR
EC401.1	27/03/09	<i>Amblyomma cajennense</i>	adulto	M	Angélica	Nº 10 - N	
EC401.2	27/03/09	<i>Amblyomma cajennense</i>	adulto	M	Angélica		
EC402.1	27/03/09	<i>Amblyomma cajennense</i>	adulto	M	Equino Estrela	Nº 2 - N	
EC402.2	27/03/09	<i>Amblyomma cajennense</i>	adulto	M	Equino Estrela		
EC402.3	27/03/09	<i>Amblyomma cajennense</i>	adulto	M	Equino Estrela		
EC402.4	27/03/09	<i>Amblyomma cajennense</i>	adulto	M	Equino Estrela	Nº 3 - N	
EC402.5	27/03/09	<i>Amblyomma cajennense</i>	adulto	M	Equino Estrela		
EC402.6	27/03/09	<i>Amblyomma cajennense</i>	adulto	M	Equino Estrela		
EC402.7	27/03/09	<i>Amblyomma cajennense</i>	adulto	M	Equino Estrela	Nº 4 - FP	N
EC402.8	27/03/09	<i>Amblyomma cajennense</i>	adulto	M	Equino Estrela		N
EC402.9	27/03/09	<i>Amblyomma cajennense</i>	adulto	M	Equino Estrela		N
EC402.10	27/03/09	<i>Amblyomma cajennense</i>	adulto	M	Equino Estrela		N
EC402.11	27/03/09	<i>Amblyomma cajennense</i>	adulto	F	Equino Estrela	Nº 1 - N	
EC402.12	27/03/09	<i>Amblyomma cajennense</i>	adulto	F	Equino Estrela		
EC402.13	27/03/09	<i>Amblyomma cajennense</i>	adulto	F	Equino Estrela		
EC403.1	27/03/09	<i>Amblyomma cajennense</i>	adulto	M	Equino Pata branca	Nº 6 - N	
EC403.2	27/03/09	<i>Amblyomma cajennense</i>	adulto	M	Equino Pata branca		
EC403.3	27/03/09	<i>Amblyomma cajennense</i>	adulto	M	Equino Pata branca		
EC403.4	27/03/09	<i>Amblyomma cajennense</i>	adulto	M	Equino Pata branca	Nº 7 - N	
EC403.5	27/03/09	<i>Amblyomma cajennense</i>	adulto	M	Equino Pata branca		
EC403.6	27/03/09	<i>Amblyomma cajennense</i>	adulto	M	Equino Pata branca		
EC403.7	27/03/09	<i>Amblyomma cajennense</i>	adulto	F	Equino Pata branca	Nº 5 - N	
EC403.8	27/03/09	<i>Amblyomma cajennense</i>	adulto	F	Equino Pata branca		
EC403.9	27/03/09	<i>Amblyomma cajennense</i>	ninfa	~~	Equino Pata branca	Nº 8 - N	
EC404.1	27/03/09	<i>Amblyomma cajennense</i>	adulto	F	Namir	Nº 9 - N	

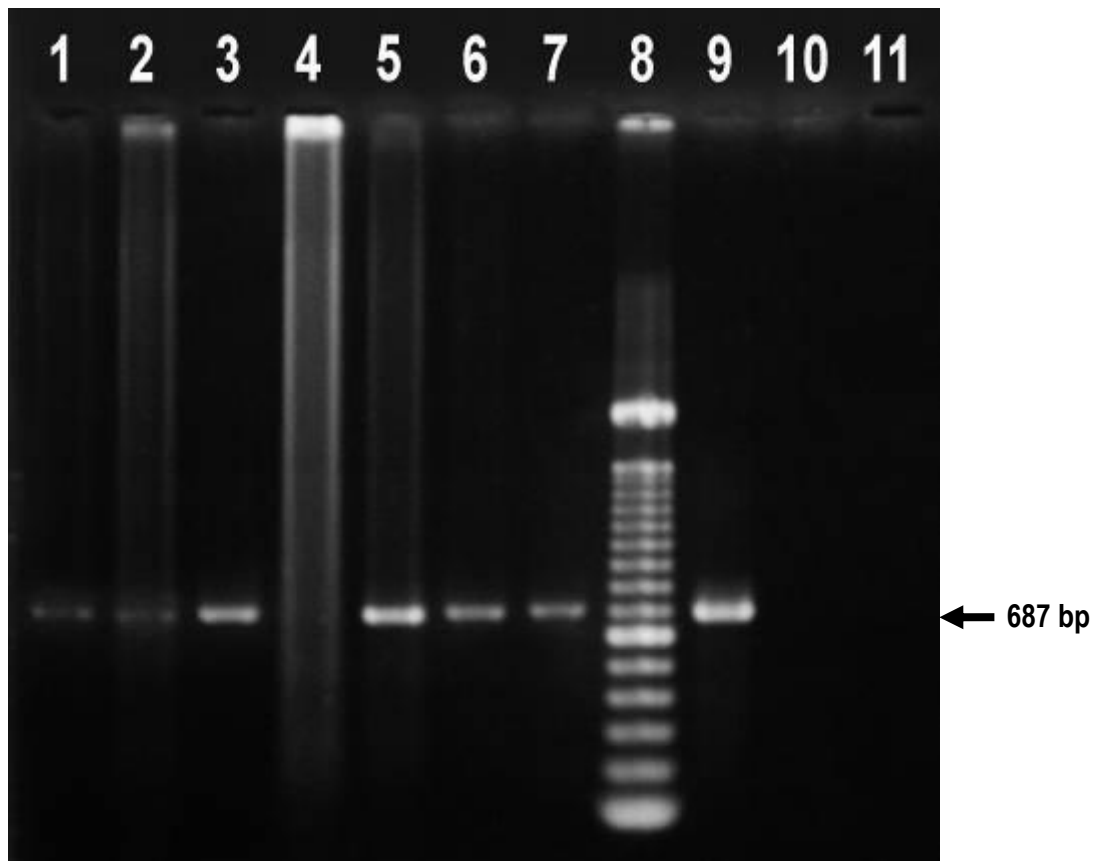
P – positivo; N – negativo; FP – fracamente positivo.

Tabela 6.7: Análise molecular das amostras de fezes coletadas de caprinos na propriedade que mantinha as cabras que foram vendidas pelo caso índice de febre Q, no Município de Itaboraí, RJ.

Registro	Data de Coleta	Material	Condições do material	Local coletado	PCR
LR 633/09	27/03/09	Fezes	úmidas	capril	N
LR 634/09	27/03/09	Fezes	úmidas	abaixo do capril	N
LR 635/09	27/03/09	Fezes	ressecadas	ao sol	N
LR 636/09	27/03/09	Fezes	úmidas	capril da ovelha prenha	N

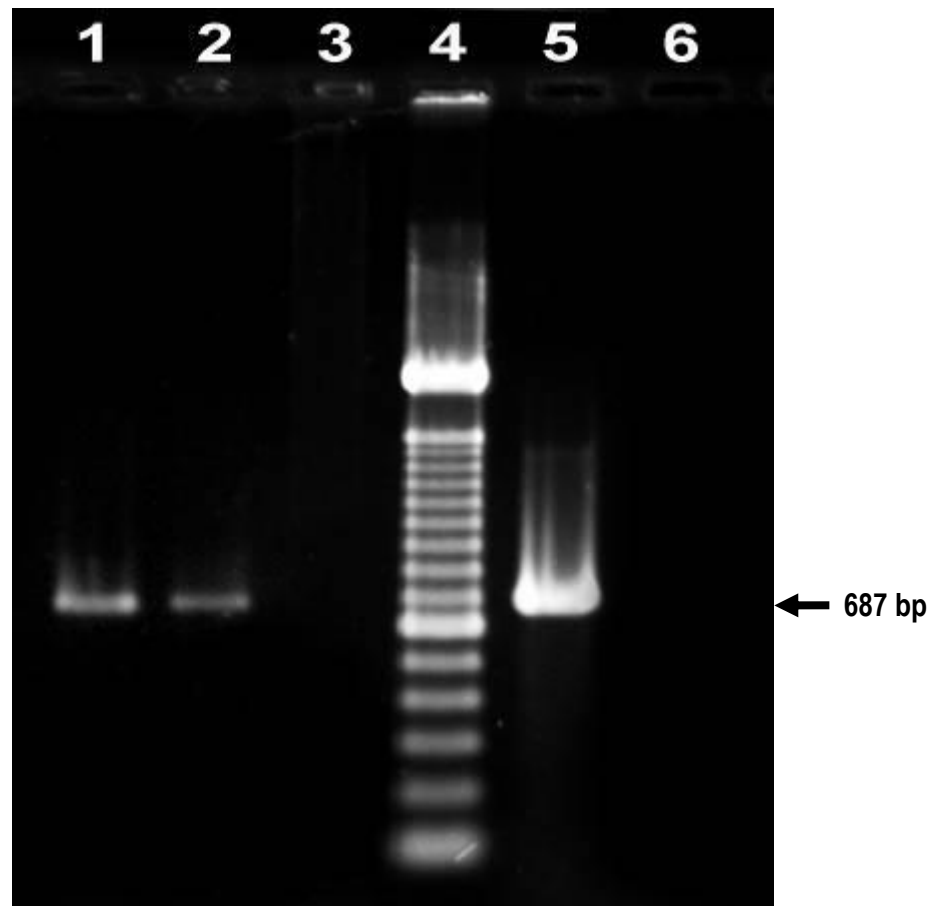
P – positivo; N – negativo; NT – não testado

Quanto à detecção do genoma de *C. burnetii*, nas cinco das sete amostras de leite analisadas obteve-se amplicons de 687 bp (Figura 6.1). Das 14 amostras de sangue coletadas em cães, em duas foi possível detectar o genoma da bactéria e os dois animais pertenciam ao proprietário que desenvolveu a febre Q em 2008 (Figura 6.2 e Figura 6.3). A sexta amostra de leite de cabra, na qual não foi possível recuperar o genoma bacteriano, após ter sido submetida à PCR nested, foi possível obter amplicon de 440 bp (Figura 6.4).



Colunas 1 a 7, produto de DNA de amostras de leite de cabras adultas; coluna 8, marcador de peso molecular (100bp-DNA ladder); coluna 9, controle positivo; coluna 10, controle negativo da PCR e coluna 11, controle negativo da extração. A seta indica a amplificação do fragmento *htpAB* de 687-bp.

Figura 6.1: Eletroforese em gel de agarose de *Coxiella burnetii*, produto da reação em cadeia da polimerase amplificado a partir de DNA total de amostras individuais de leite de caprinos na propriedade que mantinha as cabras que foram vendidas pelo caso índice de febre Q, no Município de Itaboraí, RJ.



Colunas 1 e 2, produto de DNA de amostras de soro de cães; coluna 3, produto de DNA de amostra de leite de cabra; coluna 4, marcador de peso molecular (100bp-DNA ladder); coluna 5, controle positivo; coluna 6, controle negativo da PCR. A seta indica a amplificação do fragmento *htpAB* de 687-bp.

Figura 6.2: Eletroforese em gel de agarose de *Coxiella burnetii*, produto da reação em cadeia da polimerase amplificado para purificação a partir de DNA total de amostras de soro de cães da residência do caso confirmado de febre Q no Município de Itaboraí, RJ e de uma amostra de leite que apresentou banda fraca.

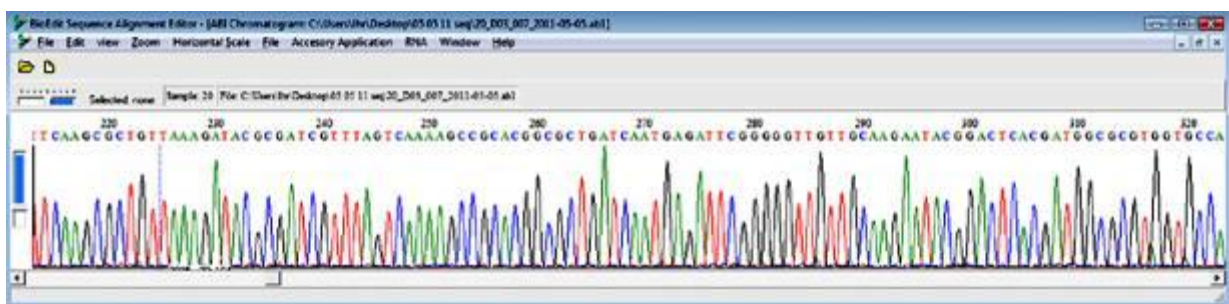
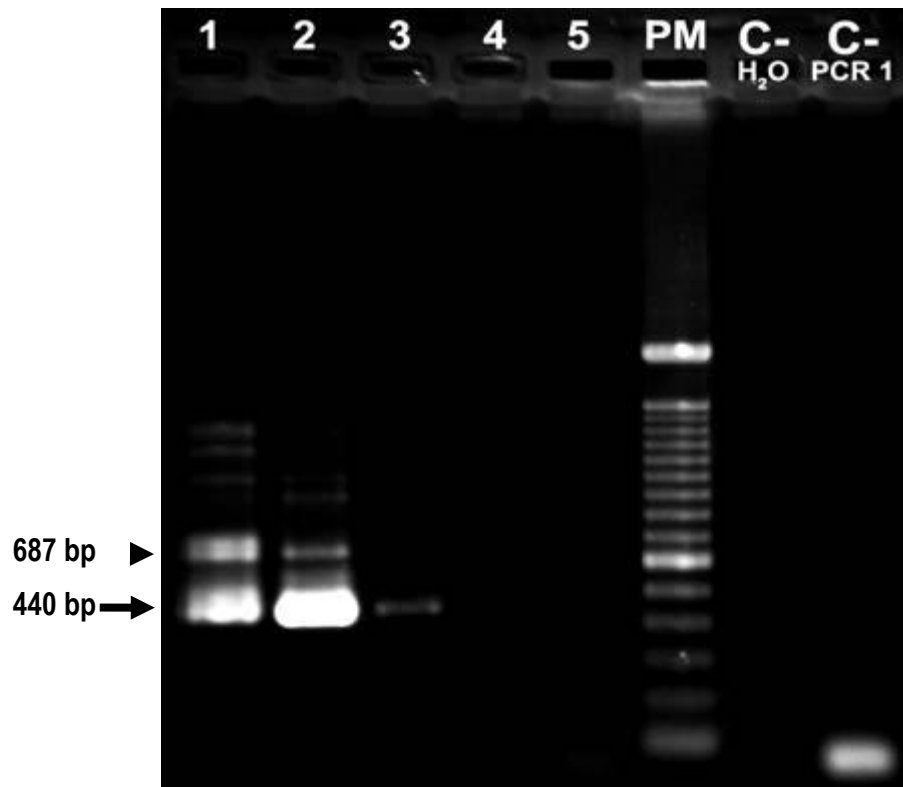


Figura 6.3: Figura parcial da análise da sequência de PCR-amplificado do DNA genômico de amostra de leite de cabra por BioEdit - cromatograma, com 99% de identidade com a sequência homóloga do gene transposon *C. burnetii* depositado no GenBank.



Coluna 1, produto de PCR Nested de controle positivo; coluna 2, produto PCR Nested de DNA de amostra de leite de cabra positiva na PCR 1; coluna 3, produto PCR Nested de DNA de amostra de leite de cabra que não amplificou na PCR 1 (Figura 3.2); colunas 4 e 5; produtos PCR Nested de DNA de amostras negativas; PM, marcador de peso molecular (100bp-DNA ladder); C-H<sub>2</sub>O, controle negativo da PCR Nested; C-PCR, controle negativo da PCR 1. A seta indica a amplificação do fragmento *htpAB* de 440-bp (QBT-N3+/QBT-N4-) e a cabeça de seta indica a amplificação do fragmento *htpAB* de 687-bp (QBT-1/QBT-2).

Figura 6.4: Eletroforese em gel de agarose de *C.burnetii*, produto da reação em cadeia da polimerase Nested amplificado a partir de produto da PCR de DNA total de amostras individuais de leite de caprinos na propriedade que mantinha as cabras que foram vendidas pelo caso índice de febre Q, no Município de Itaboraí, RJ.

O sequenciamento dos produtos de PCR amplificados do gene homólogo *htpAB* de *Coxiella burnetii* procedentes de amostras biológicas de soro dos cães e do leite das cabras, mostraram identidade de 99% para as sequências depositadas no GenBank. Os números de acesso ao GenBank das sequências obtidas neste estudo são: JF968205, JF972642, JF972643, JF972644, JF972645, JN966899, JN966900 e JN966901.

As seqüências nucleotídicas obtidas foram alinhadas e comparadas entre si e com outras seqüências nucleotídicas disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) a partir do gene alvo *htpAB*. As árvores filogenéticas foram construídas por três métodos: (i) o método baseado em distâncias de nucleotídeos - de agrupamento de vizinhos (“Neighbor Joining” - NJ), (ii) o método probabilístico de “maximum likelihood” (máxima verossimilhança) usando o programa MEGA versão 5 (Tamura et al. 2011) e (iii) o método de inferência Bayesiana usando o programa MrBayes versão 3 (Ronquist, Huelsenbeck 2003).

Considerando que os resultados foram similares com os três métodos acima descritos, a árvore filogenética a partir do método de NJ foi a selecionada para ilustrar a topologia obtida (Figura 6.5). A análise de *bootstrap* (1000 réplicas) foi realizada para gerar maior confiabilidade aos valores dos grupamentos que foram obtidos. Para comparação foram utilizadas seqüências amplificadas de amostras biológicas analisadas pelo Laboratório de Hantavirose e Rickettsioses depois da identificação do caso índice em Itaboraí: (i) uma proveniente de paciente de Itaboraí em 2009 (número de acesso JF970261); (ii) outra de um paciente do Rio de Janeiro também em 2009 (número de acesso JF970260); (iii) uma de secreção de nasofaringe de um terceiro paciente do Rio de Janeiro em 2010 (número de acesso JF968204). Adicionalmente, seqüências que apresentaram 99% a 100% de cobertura e identidade, como o genoma completo de *C. burnetii* RSA 493 (Seshadri et al. 2003) e RSA 331 (Seshadri & Samuel 2007) foram também utilizadas. O segmento utilizado do RSA 493 foi o consenso das 20 cópias do elemento *htpAB* encontrado pela ferramenta de busca de alinhamento BLAST®.

Com o objetivo de ampliar a comparação foram incluídas também as seqüências de: (i) *Coxiella* encontradas em carrapato de marsupial australiano (número de acesso EU430257) (Vilcins & Deane 2009); (ii) gene IS1111a (Hoover et al. 1992); (iii) isolado de cabra na ilha de Taiwan no continente asiático (número de acesso EU000273) (Ting et al. 2007) e (iv) isolado de carrapato do Egito (número de acesso DQ379976) (Loftis et al. 2006).

De acordo com a topologia observada (Figuras 6.5) o agrupamento (“cluster”) das amostras do projeto com as seqüências dos genes completos de *Coxiella* ocorreram em 88% das replicações. Os genes recuperados dos soros dos cães, embora monofiléticos, formaram outro agrupamento em 94% das replicações. A seqüência encontrada em carrapato de marsupial australiano formou outro agrupamento distante das demais seqüências.

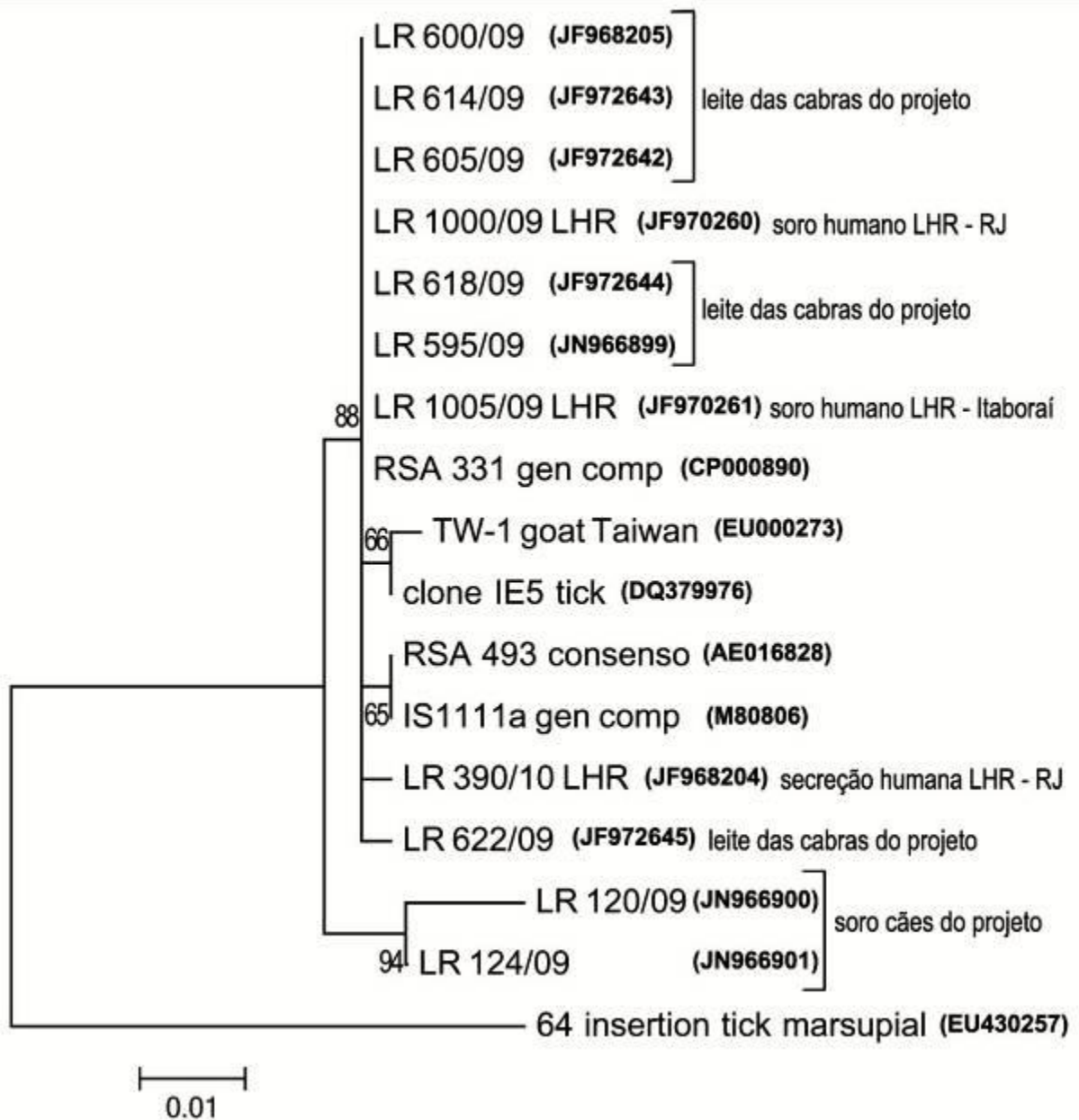


Figura 6.5: Árvore filogenética baseada nas sequências nucleotídicas obtidas no estudo e nas disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) a partir do gene alvo *htpAB* de *Coxiella burnetii*. A árvore filogenética foi construída usando software Mega 5 método “neighbor-joining”. Análise “bootstrap” foi feita com 1000 replicatas.

## 7- DISCUSSÃO

Embora a infecção por *C. burnetii* em seres humanos seja geralmente assintomática ou possa se manifestar como uma doença leve com recuperação espontânea, existem casos, cujos sintomas se assemelham aos da gripe, caracterizados por um início súbito, febre alta, chegando a 40 °C, cefaléia intensa, perda de peso, mialgia e tosse, em alguns casos complicações graves e até morte pode ocorrer. A febre Q aguda é uma doença, na maioria das vezes, similar à gripe, ou pneumonia atípica ou hepatite. Além do quadro infeccioso agudo podem ser observados casos de infecção crônica com desfecho fatal, especialmente aqueles com meningoencefalite ou miocardite, e mais frequentemente em pacientes cronicamente infectados com quadro de endocardite. Pacientes com risco de febre Q crônica incluem pessoas com anormalidades cardiovasculares e, em menor frequência, em imunocomprometidos e gestantes (Maurin, Raoult 1999; Arricau-Bouvery, Rodolakis 2005).

Neste estudo o paciente apresentou uma febre de duração de mais de 40 dias associada com dor abdominal, cefaléia, náuseas, fadiga, mal estar e depressão. O exame físico era normal, exceto pela presença da dor abdominal à palpação, manifestação similar ao que se tem descrito em literatura. O diagnóstico foi confirmado diante da soroconversão no teste de imunofluorescência indireta (IFA), identificada em duas amostras de soro pareadas, e pela obtenção, a partir da PCR, de amplicons de 687 bp para *C. burnetii*. Considerando que até a presente data, os poucos casos de febre Q diagnosticados no Brasil foram com base em evidência sorológica, é imprescindível reforçar que este é o primeiro caso de febre Q no Brasil confirmado por PCR.

Diante da informação do paciente de que teve contato direto com material proveniente do aborto de um rebanho de cabras, recém adquirido por ele, a primeira hipótese diagnóstica sugerida foi de brucelose, uma zoonose semelhante à febre Q. O resultado negativo para brucelose em associação com a história epidemiológica de contato com animais foi imprescindível para a conclusão do caso, reforçando, por sua vez, que as fontes mais comumente identificadas de infecção de *C. burnetii* para a população humana se encontram nos bovinos, caprinos e ovinos, cujas glândulas mamárias e útero apresentam grande concentração bacteriana (Angelakis, Raoult 2010).

Os resultados obtidos demonstraram a circulação do agente da febre Q na região de estudo, não somente pela identificação de caso clínico confirmado pelas técnicas sorológica e molecular, mas também pela identificação de anticorpos anti-*C. burnetii* na esposa do paciente que manipulava o leite de cabra para a produção de queijo artesanal. Além da esposa do paciente, a infecção foi também identificada em cães que ingeriram o soro do leite não

pasteurizado; nas ovelhas que pastavam em local onde foram enterradas carcaças de cabras que vieram a óbito e nas cabras adultas que foram transferidas para outro local. A detecção de DNA de *C. burnetii* no soro de dois cães do domicílio do paciente, no leite de seis das sete cabras adultas, além de um swab anal de uma destas mesmas cabras, em dois pools de pulgas coletadas em cães residentes na propriedade do paciente com febre Q e em pool de carrapatos coletados dos equinos na segunda propriedade, localidade onde os animais foram mantidos após a sua venda, indicam a circulação deste agente zoonótico em fontes de infecção, vias de transmissão e vetores biológicos, na área estudada.

A identificação da participação de população humana, animais vertebrados e invertebrados demonstra o complexo ciclo da vida da espécie *C. burnetii*, que utiliza também uma estratégia de sobrevivência no meio externo, nas formas fisiológicas da bactéria excretadas no leite, fezes, placenta ou em outros materiais biológicos, além de artrópodes como carrapatos (Angelakis & Raoult 2010). Esta característica de sobrevivência no meio externo resultou na inclusão de *C. burnetii* no grupo de agentes que podem ser utilizados como arma biológica. Assim, como a bactéria está classificada como organismo de bioterrorismo de Classe B, passa a ser imprescindível a inclusão da febre Q como doença de notificação compulsória para um diagnóstico de situação no território nacional, a partir da vigilância de quadros sindrômicos febris associados com quadro respiratório, doença hepática e/ou endocardite com hemocultura negativa, entre outras manifestações clínicas possíveis.

Diante do exposto este estudo inédito realizado em amostras de sangue de pacientes, contatantes, de animais domésticos, seus artrópodes como também em leite, fezes e swabs vaginais e anais das cabras coletados dos animais nas duas localidades incluídas no estudo, possibilitou a identificação de um foco de infecção e a confirmação das hipóteses levantadas a partir das evidências epidemiológicas previamente observadas.

Em relação ao resultado obtido com a análise do leite, a recuperação do material genético de *C. burnetii*, meses após a detecção da infecção no paciente, está em concordância com as informações disponíveis no trabalho de Rodolakis e colaboradores (2007), no qual foi possível demonstrar que as vacas e os caprinos eliminavam *C. burnetii* quase exclusivamente através do leite, enquanto que as ovelhas eliminavam principalmente pelas fezes e pelo muco vaginal.

Quanto ao teste sorológico, embora a recomendação do fabricante seja explícita quanto ao ponto de corte, no qual uma amostra deve ser considerada sororreativa a partir do título de 64 pelo IFA, estudos realizados na França preconizam títulos mais altos (256 a 512) em amostra única visando uma maior especificidade do teste, em decorrência da elevada prevalência de infecção e da frequência de anticorpos presentes na população (Maurin &



Raoult 1999). No presente estudo, pela inexistência de informação sobre a prevalência de infecção por *C. burnetii* no Brasil, todas as recomendações do fabricante foram seguidas, considerando, para uma adequada interpretação da evidência sorológica, a correlação do resultado obtido com os dados clínicos e epidemiológicos, assim como a identificação de doenças que poderiam determinar resultados falso-positivos. Assim, apesar da impossibilidade de realizar análise sorológica para a pesquisa de outros agentes que possam determinar resultados falso-positivos, a identificação de amplificação de genoma por PCR em amostras biológicas de diferentes espécies animais bem como o sequenciamento dos produtos amplificados eliminam qualquer dúvida quanto a robustez dos resultados obtidos.

Adicionalmente, estudos têm demonstrado com a utilização de teste imunoenzimático, mesmo em animais soronegativos, existe a possibilidade da eliminação de *C. burnetii* no leite. Tal fato confirma a complexidade da identificação da infecção e a importante conclusão de que a detecção de anticorpos no leite parece mais sensível do que no soro. Salienta-se que mesmo a análise molecular do soro e do coágulo das cabras apresentando-se negativa, a pesquisa de anticorpos anti-*C. burnetii* assim como do material genômico no leite deve ser realizada, uma vez que *C. burnetii* é passível de ser recuperada até 32 meses e que as cabras eliminam a bactéria através das fezes, antes e após o parto e, a duração média de eliminação é de 20 dias (Angelakis & Raoult 2010). Neste estudo verificamos que duas cabras soronegativas excretavam *C. burnetii* no leite e uma delas em secreção anal, o que alerta para a exposição ambiental deste microorganismo de alta resistência e persistência, propagando-se com formação de aerossóis, mesmo na presença de animais soronegativos.

Em relação aos artrópodes, os resultados ora encontrados destacam a recuperação do genoma da proteobactéria *C. burnetii* nesses vetores, ratificando a sua importância na perpetuação do ciclo da bactéria. Este resultado está em concordância com as informações obtidas por Angelakis e Raoult que observaram a multiplicação da proteobactéria nas células intestinais dos carrapatos com sua eliminação, em grande quantidade pelas fezes deste artrópode (Angelakis & Raoult 2010). Por outro lado é importante salientar que os carrapatos não apresentam qualquer importância na transmissão direta do agente para a população humana, mas por via indireta, considerando a eliminação através das fezes do carrapato com a sua propagação para outros hospedeiros, como, por exemplo, os vertebrados silvestres, especialmente roedores, lagomorfos e aves selvagens.

Finalmente, a partir da proposta de utilização, padronização da Nested PCR para melhorar a sensibilidade e especificidade da amplificação de DNA de *C. burnetii* em amostras obtidas a partir do “primer” que utiliza como alvo o fragmento *htpAB* de 687-bp possibilitou a detecção de genoma em amostra que através da PCR tinha sido negativa. Este resultado não

apenas é de grande importância por aumentar a capacidade de detecção de material genético em amostras biológicas, mas também pela possibilidade de se poder implantar mais uma metodologia (variante da PCR convencional) na vigilância da doença dentro do Centro de Referência Nacional para Rickettsioses que se encontra alocado no Laboratório de Hantavirose e Rickettsioses do Instituto Oswaldo Cruz.

Embora a análise filogenética das sequências obtidas neste estudo tenha demonstrado que se trata de um agrupamento monofilético, as sequências recuperadas dos soros dos cães formaram outro agrupamento, apontando para a necessidade de dar continuidade à análise com diferentes sequências nucleotídicas a partir de outros genes alvo.

Por fim, dentro do panorama acima apresentado, os resultados obtidos certamente servirão de suporte para estudos futuros que possibilitem não somente a obtenção de mais informações, mas também a manutenção de banco de dados com as sequências nucleotídicas das rickettsias no Laboratório de Hantavirose e Rickettsioses, uma melhor caracterização bacteriana e, conseqüentemente, a inclusão da febre Q como doença de notificação obrigatória em nosso território.

## 8- CONCLUSÕES

- A presença de anticorpos da classe IgG anti-*C. burnetii* em amostras de soros da esposa do paciente que manipulava o leite das cabras, em dois cães que se alimentaram do soro proveniente do produção artesanal de queijo de cabra, duas das três ovelhas e em cinco das sete cabras adultas transferidas para outro local, caracterizaram o ciclo de transmissão de *C. burnetii* entre animais domésticos com a infecção humana acidental.
- A identificação do genoma de *Coxiella burnetii*, através da reação em cadeia da polimerase em amostras de soro de dois cães residentes na propriedade do paciente sugere a instalação recente do ciclo de transmissão com a participação dos cães, provavelmente infectados a partir da ingestão do leite contaminado.
- A detecção do genoma de *Coxiella burnetii* em amostras de leitedos pequenos ruminantes além de um swab anal de uma das cabras ratifica a importância dessas fontes de infecção no ciclo de transmissão.
- A detecção do genoma de *C. burnetii* em pulgas, da espécie *Ctenocephalides felis* e de carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense*, recolhidos dos vertebrados analisados, indica presuntivamente a importância dos artrópodes na manutenção da bactéria no ambiente.
- A análise filogenética das sequências nucleotídicas parciais amplificadas a partir diferentes amostras biológicas demonstrou elevada homologia entre si e com as sequências depositadas no GenBank, confirmando que *C. burnetii* foi a responsável pelo casos de abortamento dos animais domésticos na área de estudo.
- As informações obtidas neste estudo, disponibilizadas para a vigilância epidemiológica municipal e estadual, poderão auxiliar na instituição de medidas de prevenção, considerando o grande número de pequenas propriedades com criação informal e de caráter familiar, de cabras de aptidão leiteira na região de estudo.
- A partir dos resultados obtidos e diante da certeza de os mesmos que servirão de suporte para estudos futuros, conclui-se finalmente, que possivelmente a febre Q poderá ser incluída como doença de notificação obrigatória pelo Ministério da Saúde em nosso território.

## 9- PERSPECTIVAS

Com os resultados inéditos sobre a identificação molecular de *C. burnetii* em animais domésticos obtidos, durante o período de 2010 -2011 por esta dissertação de mestrado, um projeto de pesquisa foi proposto e aprovado como tema de tese de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do IOC para ser desenvolvido a partir de 2012, baseado em vigilância de febre Q no local investigado.

O projeto de pesquisa terá como objetivo realizar a vigilância sindrômica de febre Q em pacientes, com quadro clínico-epidemiológico compatível com febre Q, atendidos durante o período de 12 meses no Hospital Municipal Desembargador Leal Júnior, no município de Itaboraí, Estado do Rio de Janeiro. Adicionalmente, além de completar a caracterização molecular de *C. burnetii*, um estudo sobre a circulação do agente em animais será realizado com a captura de animais silvestres na área onde a infecção humana e de animais como cães e cabras foi confirmada. Este projeto conta com a colaboração da Coordenação de Vigilância Epidemiológica do Município de Itaboraí. Serão elaborados relatórios para serem entregues às secretarias municipal de saúde de Itaboraí e estadual de saúde do Rio de Janeiro.

Adicionalmente, os animais e familiares do paciente serão monitorados através de coleta de amostras de dois em dois meses para verificação do status de contaminação ambiental originada pela aquisição de caprinos infectados e/ou portadores de *C. burnetii*.

Diante do exposto, o presente estudo irá colaborar para o esclarecimento de quadros febris infecciosos que possam não estar sendo diagnosticados na população em estudo, contextualizando essas informações no Município de Itaboraí, cuja implantação do Complexo Petroquímico da Petrobrás tem determinado o desmatamento e ocupação de vastas áreas assim como a migração de população de diferentes regiões do Brasil.

**10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Anderson AD, Kruszon-Moran D, Loftis AD, McQuillan G, Nicholson WL, Priestley RA, Candee AJ, Patterson NE, Massung RF 2009. Seroprevalence of Q Fever in the United States, 2003–2004. *Am J Trop Med Hyg* 81(4): 691–694.
- Angelakis E, Raoult D 2010. Review Q fever. *Veterinary Microbiology* 140: 297–309.
- Arricau-Bouvery N, Rodolakis A 2005. Is Q Fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Veterinary Research* 36: 327–349.
- Astobiza I, Barandika JF, Hurtado A, Juste RA, García-Pérez AL 2010. Kinetics of *Coxiella burnetii* excretion in a commercial dairy sheep flock after treatment with oxytetracycline. *The Veterinary Journal* 184(2): 172-175.
- Bailey MS, Trinick TR, Dunbar JA, Hatch R, Osborne JC, Brooks TJ, Green AD 2011. Undifferentiated febrile illnesses amongst British troops in Helmand, Afghanistan. *J R Army Med Corps* 157(2): 150-5.
- Bélec L, Ekala M-T, Gilquin J 1993. *Coxiella burnetii* infection among HIV-1-infected people living in Paris, France. *AIDS* 7(8): 1136-7.
- Berri M, Laroucau K, Rodolakis A 2000. The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology* 72: 285-293.
- Borges DR 1962. Serological evidence of Q fever in herders in Brazil. *Revista Paulista de Medicina* 60: 424-32.
- Brandão H, Ribeiro do Valle LA, Christovão DA 1953. Investigação sobre a febre Q em São Paulo. 1. Estudo sorológico em operários de um frigorífico. *Arq Fac Hig Saúde Publ Univ São Paulo* 7: 127-134.
- Brezina R 1976. Phase variation phenomenon in *Coxiella burnetii*. In J Kazar, RA Ormsbee, and I Tarasevitch (ed.), *Rickettsia and Rickettsiales disease*. Veda, Bratislava, Slovakia, p.221–235.
- Brouqui P, Marrie TJ, Raoult D 2003. *Coxiella*. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Manual of Clinical Microbiology, ASM PRESS, Washington, p.1030-1036.
- Buhariwalla F, Cann B, Marrie TJ 1996. A Dog-Related Outbreak of Q Fever. *Clinical Infectious Diseases* 39(4): 753-755.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [homepage on the Internet]. Q fever. Atlanta, USA [updated January 18, 2011; cited 2011]. Available from: <http://www.cdc.gov/qfever/index.html>
- Cilla G, Montes M, Pérez-Trallero E 2008. Q fever in the Netherlands – what matters is seriousness of disease rather than quantity. *Eurosurveillance* 13(37): pii=18975. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18975>.
- Costa PSG 2004. Evidências sorológicas de infecções por *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae* e *Ehrlichia chaffeensis* em indivíduos sadios e pacientes febris com e sem AIDS da região de Juiz de Fora, MG. Tese de Doutorado, Universidade Federal Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Costa PS, Brigatte ME, Greco DB 2006. Questing one Brazilian query: reporting 16 cases of Q fever from Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med trop S Paulo* 48(1): 5-9.

- Cunha BA, Nausheen S, Busch L 2009. Severe Q fever community-acquired pneumonia (CAP) mimicking Legionnaires' disease: Clinical significance of cold agglutinins, anti-smooth muscle antibodies and thrombocytosis. *Heart & Lung* 38:354-62.
- Delsing CE, Kullberg BJ, Bleeker-Rovers CP 2010. Q fever in the Netherlands from 2007 to 2010. *Neth J Med* 68(12): 382-7.
- Enserink M 2010. Questions Abound in Q-Fever Explosion in the Netherlands. *Science* 327(5963): 266-7.
- Fenollar F, Fournier PE, Raoult D 2004. Molecular Detection of *Coxiella burnetii* in the Sera of Patients with Q Fever Endocarditis or Vascular Infection. *Journal of Clinical Microbiology* 42(11): 4919-4924.
- Fournier PE, Marrie TJ, Raoult D 1998. Minireview Diagnosis of Q Fever. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 1823-1834.
- Frankel D, Richet H, Renvoisé A, Raoult D 2011. Q fever in France, 1985-2009. *Emerg Infect Dis* 17(3): 350-6.
- Gimenez DF 1964. Staining rickettsiae in yolk sac cultures. *Stain Technol* 30: 135-137.
- Ghigo E, Imbert G, Capo C, Raoult D, Mege JL 2003. Interleukin-4 induces *Coxiella burnetii* replication in human monocytes but not in macrophages. *Ann NY Acad Sci* 990:450.
- Guatteo R, Beaudeau F, Joly A, Seegers H 2007. *Coxiella burnetii* shedding by dairy cows. *Vet Res* 38: 849-860.
- Hall TA 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95-98.
- Harris RJ, Storm PA, Lloyd A, Arens M, Marmion BP 2000. Long-term persistence of *Coxiella burnetii* in the host after primary Q fever. *Epidemiol Infect* 124(3): 543-549.
- Hilbert A, Reith P, Brockmann SO, Tyczka J, Fischer SF, Piechotowski I, Wagner-Wiening C, Winter CH, Bendak J, Meier C, Spengler D, Miller T, Kleine-Albers C, Renner C, Koepsel U, Hensler E, Henning K, Fröhlich A, Conraths FJ, Kramer M. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2011. Epidemiological enquiries in two Q fever outbreaks in a community of Baden-Württemberg during 2008 and 2009. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 124(7-8): 295-302.
- Honstetter A, Ghigo E, Moynault A, Capo C, Toman R, Akira S, Takeuchi O, Lepidi H, Raoult D, Mege JL 2004. Lipopolysaccharide from *Coxiella burnetii* is involved in bacterial phagocytosis, filamentous actin reorganization, and inflammatory responses through toll-like receptor 4. *The Journal of Immunology* 172(6): 3695-3703.
- Hoover TA, Vodkin MH, Williams J 1992. A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. *Journal of Bacteriology* 174: 5540-5548.
- Hotta A, Kawamura M, To H, Andoh M, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K 2002. Phase Variation Analysis of *Coxiella burnetii* during Serial Passage in Cell Culture by Use of Monoclonal Antibodies. *Infection and Immunity* 70(8): 4747-4749.
- Houpikian P, Raoult D 2005. Blood culture-negative endocarditis in a reference center: etiologic diagnosis of 348 cases. *Medicine (Baltimore)* 84: 162-173.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). [updated august 29, 2009; cited 2011]. Available from: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2009/pop2009\\_dou.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2009/pop2009_dou.pdf)

- Izzo AA, Marmion BP 1993. Variation in interferon-gamma responses to *Coxiella burnetii* antigens with lymphocytes from vaccinated or naturally infected subjects. *Clin Exp Immunol* 94: 507-515.
- Karagiannis I, Morroy G, Rietveld A, Horrevorts AM, Hamans M, Francken P, Schimmer B 2007. A Q fever outbreak in the Netherlands: a preliminary report. *Eurosurveillance* 12(32): pii=3247. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3247>
- Karagiannis I, Schimmer B, Van Lier A, Timen A, Schneeberger P, Van Rotterdam B, De Bruin A, Wijkmans C, Rietveld A, Van Duynhoven Y 2009. Investigation of a Q fever outbreak in a rural area of The Netherlands. *Epidemiol Infect* 137(9): 1283-94.
- Klaassen CHW, Nabuurs-Franssen MH, Tilburg JJHC, Hamans MAWM, Horrevorts AM 2009. Multigenotype Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 15(4): 613-614.
- Klee SR, Tyczka J, Ellerbrok H, Franz T, Linke S, Baljer G, Appel B 2006. Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. *BMC Microbiology*. 6:2 doi:10.1186/1471-2180-6-2.
- Lamas CC, Eykyn SJ 2003. Blood culture negative endocarditis: analysis of 63 cases presenting over 25 years. *Heart* 89: 258-262.
- Lamas CC, Rozental T, Bóia MN, Favacho AR, Kirsten AH, da Silva AP, de Lemos ER 2009. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in human immunodeficiency virus-positive patients in Jacarepaguá, Rio de Janeiro, Brazil. *Clin Microbiol Infect Suppl* 2: 140-1.
- Lemos ER, Rozental T, Mares-Guia MA, Almeida DN, Moreira N, Silva RG, Barreira JD, Lamas CC, Favacho AR, Damasco PV 2011. Q fever as a cause of fever of unknown origin and thrombocytosis: first molecular evidence of *Coxiella burnetii* in Brazil. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. 11(1):85-87 doi: 10.1089/vbz.2009.0261.
- Loftis AD, Reeves WK, Szumlas DE, Abbassy MM, Helmy IM, Moriarity JR, Dasch GA 2006. Rickettsial agents in Egyptian ticks collected from domestic animals. *Exp Appl Acarol*, 40(1): 67-81.
- Lührmann A, Roy CR 2007. *Coxiella burnetii* Inhibits Activation of Host Cell Apoptosis through a Mechanism That Involves Preventing Cytochrome c Release from Mitochondria. *Infection and Immunity* 75(11): 5282-5289.
- Marrie TJ 2006. Q fever. In Guerrant RL, Walker DH, Weller PF, ed. *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens, and Practice*, 2nd ed. Philadelphia, Elsevier Churchill Livingstone, p. 574-577.
- Marrie TJ 1990. Q fever - A review. *Can Vet J* 31(8): 555-63.
- Maurin M, Raoult D 1999. Q Fever. *Clin Microbiol Rev* 12(4): 518-53.
- McCaul TF, Williams JC 1981. Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *J Bacteriol* 147(3): 1063-76.
- McDade JE 1990. Historical aspects of Q fever. In Marrie TJ ed. *Q fever. Volume I. The Disease*. CRC Press, Boston, pp. 5-21.
- Montes M, Cilla G, Vicente D, Ercibengoa M, Perez-Trallero E 2006. Gipuzkoa, Basque Country, Spain (1984-2004), a Hyperendemic Area of Q Fever. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1078: 129-132.
- Olson JG, McDade J 1994. Rickettsia and Coxiella. In Murray PR. *Manual of Clinical Microbiology*. 6. ed. ASM PRESS, Washington, p. 678-684.

- Omsland A, Cockrell DC, Howe D, Fischer ER, Virtaneva K, Sturdevant DE, Porcella H, Robert A 2009. Host cell-free growth of the Q fever bacterium *Coxiella burnetii*. PNAS 106(11): 4430–4434.
- Penttila IA, Harris RJ, Storm P, Haynes D, Worswick DA, Marmion BP 1998. Cytokine dysregulation in the post-Q-fever fatigue syndrome. QJM 91: 549-560.
- Prefeitura Municipal de Itaboraí. Site oficial. [updated June 03, 2010; cited 2011]. Available from: <http://www.itaborai.rj.gov.br/home/index.php?pg=conteudo&id=20>
- Raoult D, Levy PI, Dupont HT, Chicheportiche C, Tamalet C, Gastaut JA, Salducci J 1993. Q fever and HIV infection. AIDS 7: 81-86.
- Raoult D, Marrie T 1995. Q fever. Clin Infect Dis 20(3): 489-95.
- Raoult D, Parola P 2007. Rickettsial diseases. Unité des Rickettsies Université de la Méditerranée Marseille, France. Informa healthcare. New York London, 379 pp.
- Regnery RL, Childs JE, Koehler JE. 1995. Infections associated with *Bartonella* species in persons infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 21(Suppl 1): S94-8.
- Ribeiro do Valle LA, Bassoi ON, Castro RM, Ferreira JM 1955. Febre Q em São Paulo. Primeiro caso confirmado por estudos sorológicos. Rev Paul Med 46(6): 447-56.
- Ribeiro-Neto A, Nikitin T, Valentini H, Ribeiro IF 1964. Estudo sobre Febre Q em São Paulo, ocorrência em rebanhos bovinos do Vale Paraíba. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 6(4): 137-141.
- Riemann HP, Brant PC, Franti CE, Reis R, Buchanan AM, Stormont C, Behymer DE 1974. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Coxiella burnetii* among students and other personnel in veterinary colleges in California and Brazil. Am J Epidemiol 100(3): 197-208.
- Riemann HP, Brant PC, Behymer DE, Franti CE 1975. *Toxoplasma gondii* and *Coxiella burnetii* antibodies among Brazilian slaughterhouse employees. Am J Epidemiol 102(5): 386-93.
- Rodolakis A 2009. Q Fever in Dairy Animals. Rickettsiology and Rickettsial Diseases-Fifth International Conference: Ann. N.Y. Acad. Sci. 1166: 90–93.
- Rodolakis A, Berri M, Héchard C, Caudron C, Souriau A, Bodier CC, Blanchard B, Camuset P, Devillechaise P, Natorp JC, Vadet JP, Arricau-Bouvery N 2007. Comparison of *Coxiella burnetii* Shedding in Milk of Dairy Bovine, Caprine, and Ovine Herds. J Dairy Sci 90(12): 5352-60.
- Roest HI, Ruuls RC, Tilburg JJ, Nabuurs-Franssen MH, Klaassen CH, Vellema P, van den Brom R, Dercksen D, Wouda W, Spierenburg MA, van der Spek AN, Buijs R, de Boer AG, Willemsen PT, van Zijderveld FG 2011. Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* from ruminants in Q fever outbreak, the Netherlands. Emerg Infect Dis 17(4): 668-75.
- Roest HI, Tilburg JJ, van der Hoek W, Vellema P, van Zijderveld FG, Klaassen CH, Raoult D 2011. The Q fever epidemic in The Netherlands: history, onset, response and reflection. Epidemiol Infect 139(1): 1-12.
- Roman MJ, Coriz PD, Baca OG 1986. A proposed model to explain persistent infection of host cells with *Coxiella burnetii*. J Gen Microbiol 132:1415–22.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics. 19(12):1572-4.
- Samuel JE, Kiss K, Varghees S 2003. Molecular pathogenesis of *Coxiella burnetii* in a genomics era. Ann N Y Acad Sci 990: 653-63.



- Seshadri R, Paulsen IT, Eisen JA, Read TD, Nelson KE, Nelson WC, Ward NL, Tettelin H, Davidsen TM, Beanan MJ, Deboy RT, Daugherty SC, Brinkac LM, Madupu R, Dodson RJ, Khouri HM, Lee KH, Carty HA, Scanlan D, Heinzen RA, Thompson HA, Samuel JE, Fraser CM, Heidelberg JF 2003. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. Proc Natl Acad Sci U S A 100(9): 5455–60.
- Seshadri R., Samuel JE 2007. Genome sequencing of phylogenetically and phenotypically diverse *Coxiella burnetii* isolates. Submitted (NOV-2007) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
- Shannon JG, Heinzen RA 2009. Adaptive Immunity to the Obligate Intracellular Pathogen *Coxiella Burnetii*. Immunol Res 43(1-3):138–148.
- Schimmer B, Morroy G, Dijkstra F, Schneeberger PM, Weers-Pothoff G, Timen A, Wijkmans C, van der Hoek W 2008. Large ongoing Q fever outbreak in the south of The Netherlands, 2008. Eurosurveillance, 13(31):pii=18939. Available from:  
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18939>
- Siciliano RF, Strabelli TM, Paddock CD, Jones TF, Zeigler R, Rodrigues C, Uip DE, Castelli JB, Sampaio RO, Grinberg M, Colombo S, Santos FCP, Nascimento EMM 2007. Culture-negative endocarditis in Sao Paulo, Brazil. Serologic investigation of *Coxiella burnetii* and *Bartonella spp.* Clinical Research in Cardiology, 96: 411.
- Siciliano RF, Strabelli TM, Zeigler R, Rodrigues C, Castelli JB, Grinberg M, Colombo S, Silva LJ, Nascimento EMM, Santos FCP, Uip DE 2006. Infective endocarditis due to *Bartonella spp.* and *Coxiella burnetii*: experience at a cardiology hospital in São Paulo, Brazil. Ann N Y Acad Sci 1078: 215-22.
- Siciliano RF, Ribeiro HB, Furtado RHM, Castelli JB, Sampaio RO, Santos FCP, Colombo S, Grinberg M, Strabelli TMV. 2008. Endocarditis due to *Coxiella burnetii* (Q fever): a rare or little diagnosed disease? Case report. Rev Soc Bras Med Trop 41(4):409-12.
- Sprong H, Tjisse-Klasen E, Langelaar M, De Bruin A, Fonville M, Gassner F, Takken W, Van Wieren S, Nijhof A, Jongejan F, Maassen CB, Scholte EJ, Hovius JW, Emil Hovius K, Spitalská E, Van Duynhoven YT 2011. Prevalence of *Coxiella burnetii* in Ticks After a Large Outbreak of Q Fever. Zoonoses Public Health [Epub ahead of print] doi: 10.1111/j.1863-2378.2011.01421.x
- Stein A, Raoult D 1995. Q fever endocarditis. Eur Heart J 16(Suppl B): 19-23.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.
- Ting LJ, Chen LS, Lee MS, Lin CH, Lee SH, Chao PH 2007. Identification of *Coxiella burnetii* in goats in Taiwan. Submitted (JUN-2007) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
- Tissot-Dupont H, Raoult D 2008. Q fever. Infect Dis Clin North Am 22(3): 505-14, ix.
- Travassos J, Ubatuba A, Silva NP, Mello MT 1954. Febre Q no Rio de Janeiro. Cienc e Cult 6:199-200.
- Van den Wijngaard CC, van Pelt W, Nagelkerke NJ, Kretzschmar M, Koopmans MP 2011. Evaluation of syndromic surveillance in the Netherlands: its added value and recommendations for implementation. Euro Surveill 16(9): pii=19806. Available from:  
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19806>

- Van der Hoek W, Dijkstra F, Schimmer B, Schneeberger PM, Vellema P, Wijkmans C, ter Schegget R, Hackert V, van Duynhoven Y 2010. Q fever in the Netherlands: an update on the epidemiology and control measures. *Euro Surveill* 15(12): pii=19520. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19520>
- Van der Hoek W, Meekelenkamp JC, Leenders AC, Wijers N, Notermans DW, Hukkelhoven CW 2011. Antibodies against *Coxiella burnetii* and pregnancy outcome during the 2007-2008 Q fever outbreaks in The Netherlands. *BMC Infect Dis* 11:44.
- Van der Hoek W, Versteeg B, Meekelenkamp JC, Renders NH, Leenders AC, Weers-Pothoff I, Hermans MH, Zaaijer HL, Wever PC, Schneeberger PM 2011. Follow-up of 686 patients with acute Q fever and detection of chronic infection. *Clin Infect Dis* 52(12): 1431-6.
- Vilcins IME, Old JM, Deane E 2009. Molecular detection of *Rickettsia*, *Coxiella* and *Rickettsiella* DNA in three native Australian tick species. *Exp Appl Acarol*, 49(3): 229-242. DOI: 10.1007/s10493-009-9260-4.
- Voth DE, Heinzen RA 2007. Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of *Coxiella burnetii*. *Celular Microbiology* 9(4): 829-40.
- Weiss E, Moulder JW 1984. Genus III. *Coxiella*. In NR Krieg and JG Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md. p. 701-704.
- Whelan J, Schimmer B, DE Bruin A, VAN Beest Holle MR, VAN DER Hoek W, Ter Schegget R. 2011. Visits on 'lamb-viewing days' at a sheep farm open to the public was a risk factor for Q fever in 2009. *Epidemiol Infect.* 2011 Aug 11:1-7. [Epub ahead of print]
- Willems H, Thiele D, Frolich-Ritter R, Krauss H 1994. Detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk using the polymerase chain reaction (PCR). *Zentbl Vetmed* 41: 580-7.
- Zamboni DS, Campos MA, Torrecilhas AC, Kiss K, Samuel JE, Golenbock DT, Lauw FN, Roy CR, Almeida IC, Gazzinelli RT 2004. Stimulation of toll-like receptor 2 by *Coxiella burnetii* is required for macrophage production of pro-inflammatory cytokines and resistance to infection. *J Biol Chem* 279(52): 54405-15.

## ANEXO 1

**TRABALHOS CIENTÍFICOS RESULTANTES DESTA DISSERTAÇÃO****Artigos completos publicados em periódicos**

ELBA RS LEMOS, TATIANA ROZENTAL, MARIA ANGÉLICA M MARES-GUIA, DANIELE NP ALMEIDA, NAMIR MOREIRA, RAPHAEL G SILVA, JAIRO D BARREIRA, CRISTIANE C LAMAS, ALEXSANDRA R FAVACHO, PAULO V DAMASCO. Q fever as a cause of fever of unknown origin and thrombocytosis: first molecular evidence of *Coxiella burnetii* in Brazil. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, volume 11, number 1, 2011. doi:10.1089/vbz.2009.0261. (Anexo 4)

**Resumo publicado em revista.**

MARIA ANGÉLICA M.M. MARES-GUIA, TATIANA ROZENTAL, ALEXSANDRA R.M. FAVACHO, ALEXANDRO GUTERRES, RAPHAEL GOMES, DANIELE N.P.DE ALMEIDA, NAMIR S. MOREIRA, ENDIÁ B. ALMEIDA, JAIRO D. BARREIRA, ANDREA L. SANTANA AND ELBA R.S. LEMOS. A serological and molecular study of *Coxiella burnetii* in human, vertebrates and arthropods in Rio de Janeiro, Brazil: preliminary results. Tropical Medicine and International Health, European Journal, October 2011, Blackwell Publishing Ltd, 16 (suppl I), p.181-182. (Anexo 5)

**Apresentação de Trabalho/Congresso**

MARIA ANGÉLICA M.M. MARES-GUIA, TATIANA ROZENTAL, ALEXSANDRA R.M. FAVACHO, ALEXANDRO GUTERRES, RAPHAEL GOMES, DANIELE N.P.DE ALMEIDA, NAMIR S. MOREIRA, ENDIÁ B. ALMEIDA, JAIRO D. BARREIRA, ANDREA L. SANTANA AND ELBA R.S. LEMOS. A serological and molecular study of *Coxiella burnetii* in human, vertebrates and arthropods in Rio de Janeiro, Brazil: preliminary results. 7th European Congress on Tropical Medicine & International Health, Barcelona, October, 3rd-6th, 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

## ANEXO 2



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

Rio de Janeiro, 02 de agosto de 2010.

Carta: 039/10

De: CEP/FIOCRUZ

Para: - Dra. Elba Regina Sampaio de Lemos e  
- Dra. Helene Santos Barbosa

Prezadas Senhoras,

Estamos encaminhando o parecer do protocolo **552/10** intitulado "**Coxiella burnetii no Município de Itaboraí, Rio de Janeiro: estudo sorológico e molecular em população humana e de animais em área de ocorrência do primeiro caso confirmado de febre Q**" com a deliberação de **APROVADO**.

Atenciosamente

  
Carla Dias Netto  
Secretaria Geral  
CEP/Fiocruz

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos  
Fundação Oswaldo Cruz  
Avenida Brasil, 4.036 - Sala: 705  
Manguinhos - RJ. - CEP.: 21.040-360  
Tels.: (21) 3882-9011 Fax: (21) 2561-4815  
e-mail: [etica@fiocruz.br](mailto:etica@fiocruz.br)

## ANEXO 3



SECRETARIA DE SAÚDE

**TERMO DE COMPROMISSO**

Como representante legal da Secretária Municipal de Saúde, declaro que conheço o inteiro teor do projeto intitulado "***Coxiella burnetii* no Município de Itaboraí, Rio de Janeiro: estudo sorológico e molecular em população humana e de animais em área de ocorrência do primeiro caso confirmado de febre Q.**" sob a coordenação da Dra Elba Regina Sampaio de Lemos, e que tenho conhecimento dos compromissos assumidos no referido projeto pela pesquisadora e pelos demais membros participantes.

Rio de Janeiro, 05 de julho de 2010

Therezinha Freitas  
Secretária Municipal de Saúde

## ANEXO 4

VECTOR-BORNE AND ZOOLOGICAL DISEASES  
 Volume 11, Number 1, 2011  
 © Mary Ann Liebert, Inc.  
 DOI: 10.1089/vbz.2009.0261

## Q Fever as a Cause of Fever of Unknown Origin and Thrombocytosis: First Molecular Evidence of *Coxiella burnetii* in Brazil

Elba R.S. Lemos,<sup>1</sup> Tatiana Rozental,<sup>1</sup> Maria Angélica M. Mares-Guia,<sup>1</sup> Daniele N.P. Almeida,<sup>1</sup> Namir Moreira,<sup>1</sup> Raphael G. Silva,<sup>1</sup> Jairo D. Barreira,<sup>1</sup> Cristiane C. Lamas,<sup>1</sup> Aleksandra R. Favacho,<sup>1</sup> and Paulo V. Damasco<sup>2</sup>

### Abstract

We report a case of Q fever in a man who presented with fever of 40 days duration associated with thrombocytosis. Serological and molecular analysis (polymerase chain reaction) confirmed infection with *Coxiella burnetii*. A field study was conducted by collecting blood samples from the patient's family and from the animals in the patient's house. The patient's wife and 2 of 13 dogs showed seroreactivity. Our data indicate that *C. burnetii* may be an underrecognized cause of fever in Brazil and emphasize the need for clinicians to consider Q fever in patients with a febrile illness, particularly those with a history of animal contact.

**Key Words:** Brazil—Fever of unknown origin—Q fever—Serologic and molecular diagnosis—Thrombocytosis.

**Q** FEVER IS A WORLDWIDE ZOOLOGICAL DISEASE caused by *Coxiella burnetii*, a small obligate intracellular Gram-negative bacterium of the order Legionellales. The disease has a broad spectrum of clinical manifestations, ranging from a limited febrile illness, pneumonia, and hepatitis to life-threatening forms such as endocarditis and meningoenzephalitis (Tissot-Dupont and Raoult 2008, Cunha et al. 2009). Ticks, farm animals, pets, and many wild animals are possible reservoirs of infection. Transmission to humans is usually via inhalation of contaminated aerosols from urine, feces, milk, and birth products or less commonly by ingestion of unpasteurized milk from infected farm animals. Occupational groups such as veterinarians, farmers, and slaughterhouse workers are at highest risk. Although Q fever is distributed throughout the world, its distribution in Brazil, where it is not a reportable disease, is poorly defined.

Since the first seroepidemiologic study was published in 1953, little additional information has become available and only four cases associated with endocarditis have been confirmed by serology or Gimenez staining of valves (Brandão et al. 1953, Travassos et al. 1954, Ribeiro do Valle et al. 1955,

Riemann et al. 1974, Costa et al. 2006, Siciliano et al. 2008, Lamas et al. 2009).

On October 13, 2008, a 47-year-old man from Itaboraí, state of Rio de Janeiro, in southeastern Brazil, was admitted to the Gaffrée Guinle University Hospital/UNIRIO with a fever of >40 days duration, associated with abdominal pain, headache, nausea, fatigue, malaise, and depression. Physical examination was unremarkable, except for abdominal pain on palpation.

Laboratory exams revealed a high erythrocyte sedimentation rate (82 mm in the first hour), leukocytosis (13,100/mm<sup>3</sup>) with neutrophilia (74%), and thrombocytosis (611,000/mm<sup>3</sup>). Bone marrow aspiration showed slight hyperplasia of the monocyte-macrophage system and granulocytic cells. Echocardiogram and tomographic scans of the abdomen and thorax were normal. Treatment with a fourth-generation cephalosporin (cefepime 4g/day) was begun, but without improvement.

The patient reported that 3 months before falling ill he had purchased 12 goats (Saneen breed), some of them for personal milk supply and some to sell to the community. The goats

<sup>1</sup>Laboratory of Hantaviruses and Rickettsioses, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

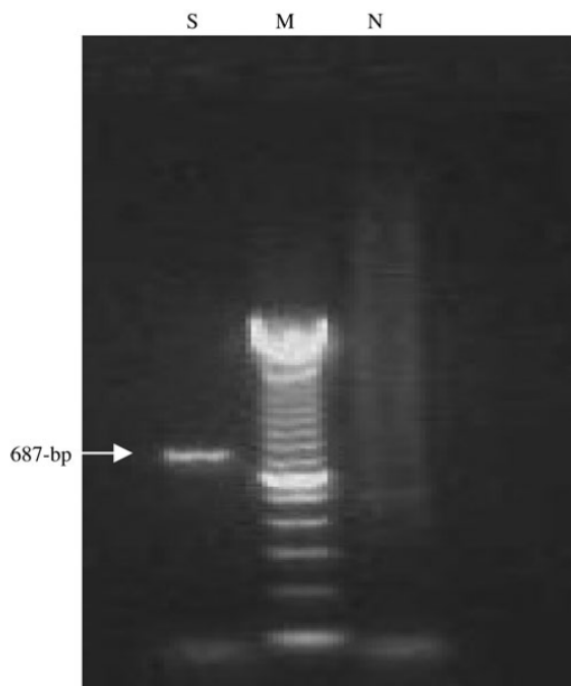
<sup>2</sup>Gaffrée Guinle Hospital, Federal University of Rio de Janeiro—UNIRIO, Rio de Janeiro, Brazil.

Partial data of this study were presented as a poster at the XLV Brazilian Society of Tropical Medicine Meeting, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, March 2009.

were kept together with other animals, 14 dogs and 2 cats. Additionally, the patient had a history of contact with the birth products of three goats that had aborted, 3 weeks before the onset of the symptoms.

Because of a high clinical suspicion of brucellosis, treatment with doxycycline (200 mg/day) and rifampin (600 mg/day) was begun and the fever disappeared in 4 days.

Serological testing for brucellosis, toxoplasmosis, leishmaniasis, cytomegalovirus, hepatitis B and C, syphilis, bartonellosis, ehrlichiosis, rickettsiosis, and histoplasmosis and detection of circulating capsular polysaccharide antigen from *Cryptococcus neoformans* performed on the first available serum sample collected on 40th day after onset of illness were negative. Mycobacteria, leishmania, and fungi cultures were also negative. Two serum samples collected 40 and 70 days after onset of the illness were tested for *C. burnetii* using a commercial indirect immunofluorescence assay for IgG (Panbio). Titers of specific antibodies to phase II antigen of 256 and 1024 were detected in the first and second serum samples, respectively. After DNA extraction using a commercial kit (QIAamp DNA; Qiagen), polymerase chain reaction (PCR) was performed and heat shock proteins genes (*htpAB*) of *C. burnetii* (687bp) were amplified from the first serum sample DNA (Hoover et al. 1992). The PCR was repeated without a positive control and the result was confirmed, but DNA sequencing of the amplicon detected was not possible because of insufficient serum samples (Fig. 1). Rifampin was discontinued and the patient was treated with doxycycline for 21 days.



**FIG. 1.** Agarose gel electrophoresis of *Coxiella burnetii* polymerase chain reaction product amplified from total DNA of serum sample. S, sample from the patient with Q fever; M, molecular size markers (100-bp ladder); N, negative control. The arrow indicates the amplification of a 687-bp *htpAB* fragment.

In December 2008, a field investigation was carried out in the patient's home and blood samples from his family (wife and daughter) and 13 dogs were collected for analysis. His wife, who handled and fed them goat milk, told the investigators that one of their dogs (a 7-month-old female) had died, and another had aborted puppies, while the patient was in hospital. The wife was seroreactive for *C. burnetii* (titer of anti-phase II IgG of 128) and 2 of the 13 dogs showed indirect immunofluorescence assay (IFA) reactivity (titers of anti-phase II IgG of 64 and 128) but displayed no clinical manifestations. Unfortunately, the goats had been sold to another farmer so biological samples from these animals were not available for analysis.

All the symptoms were resolved and the patient was discharged at 4 weeks after admission. A third sample of the patient's serum collected at 6 months after the onset of illness was analyzed and showed an IgG titer of 128 against phase II antigens of *C. burnetii*.

Although several classical clinical descriptions of Q fever have been recognized in different regions of the world, some atypical and severe forms can be difficult to identify. Fever of unknown origin, clinical pictures mimicking systemic inflammatory disease, or lymphoproliferative disorders have also been described (Tissot-Dupont and Raoult 2008, Cunha et al. 2009). This article reports a case of Q fever presenting as fever of unknown origin and thrombocytosis that recovered after 3 weeks of treatment with doxycycline. Although thrombocytopenia occurs in about 25% of patients in the early phase of the illness, the presence of reactive thrombocytosis has also been described during its later phase (Tissot-Dupont and Raoult 2008, Cunha et al. 2009).

Studies of *C. burnetii* in humans and animals are frequently based on serologic tests, and the prevalence of *C. burnetii* infection varies widely from one country to another (Tissot-Dupont and Raoult 2008). Our findings provide definitive confirmation of Q fever in Brazil, where there are no molecular studies documenting *C. burnetii* infection in humans or animals. Anti-*C. burnetii* antibodies were also detected in the patient's wife and in two dogs, providing further evidence of the circulation of *C. burnetii* in Itaboraí, Rio de Janeiro, Brazil.

Although the PCR results were positive, DNA sequencing of the detected amplicon was not possible because of lack of sufficient biological material in the first serum sample.

Further studies including molecular characterization of *C. burnetii* are necessary to establish the extent and the importance of Q fever in Brazil.

#### Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

#### References

- Brandão, H, Ribeiro do Valle, LA, Christovão, DA. Investigação sobre a febre Q em São Paulo. 1. Estudo sorológico em oper rios de um frigor fico. Arq Fac Hig S de Publ Univ São Paulo 1953; 7:127-134.
- Costa, PS, Brigatte, ME, Greco, DB. Questing one Brazilian query: reporting 16 cases of Q fever from Minas Gerais, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo 2006; 48:5-9.
- Cunha, BA, Nausheen, S, Busch, L. Severe Q fever community-acquired pneumonia (CAP) mimicking Legionnaires' disease:



***Coxiella burnetii* IN BRAZIL**

87

- clinical significance of cold agglutinins, anti-smooth muscle antibodies and thrombocytosis. *Heart Lung* 2009; 38: 354–362.
- Hoover, TA, Vodkin, MH, Williams, J. A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. *J Bacteriol* 1992; 174:5540–5548.
- Lamas, CC, Rozental, T, Boia, MN, Favacho, AR, et al. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in human immunodeficiency virus-positive patients in Jacarepaguá, Rio de Janeiro, Brazil. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15:140–141.
- Ribeiro do Valle, LA, Bassoi, ON, Castro, RM, Ferreira, JM. Febre Q em São Paulo. Primeiro caso confirmado por estudos sorológicos. *Rev Paul Med* 1955; 46:81–90.
- Riemann, HP, Brant, PC, Franti, CE, Reis, R, et al. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Coxiella burnetii* among students and other personnel in veterinary colleges in California and Brazil. *Am J Epidemiol* 1974; 100:197–208.
- Siciliano, RF, Ribeiro, HB, Furtado, RHM, Castelli, JB, et al. Endocarditis due to *Coxiella burnetii* (Q fever): a rare or little diagnosed disease? Case report. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 41:409–412.
- Tissot-Dupont, H, Raoult, D. Q fever. *Infect Dis Clin North Am* 2008; 22:505–514.
- Travassos, J, Ubatuba, A, Silva, NP, Mello, MT. Febre Q no Rio de Janeiro. *Cienc e Cult* 1954; 6:199–200.

Address correspondence to:

Elba R.S. Lemos

Laboratory of Hantaviruses and Rickettsioses

Oswaldo Cruz Institute

FIOCRUZ

Pavilhão Hélio Peggy Pereira

Sala B116, FIOCRUZ

Avenida Brasil, 4365

Rio de Janeiro 22040-900

Brazil

E-mail: [elemos@ioc.fiocruz.br](mailto:elemos@ioc.fiocruz.br)



## ANEXO 5

## Abstracts of the 7th European Congress on Tropical Medicine and International Health

weight/obesity and stunting) households is increasing. While intestinal parasites are usually prevalent in these countries, their role in the dual burden phenomenon of overweight/obesity and stunting has so far been neglected. We studied the associations between dual burden households and intestinal parasite infection in a rural community of Venezuela.

**METHODS** We examined data of 41 households (142 children and 99 adults) in a low income community with measured data on height, weight and parasitic infections. Dual burden households were defined as households with an overweight/obese adult (BMI > 25) together with a stunted child (height for age z score < -2.) Intestinal parasite infection was determined by direct and ferric haematoxylin stained smears of two faecal samples.

**RESULTS** Sixty-five percent of the adults in the community were either overweight (39%) or obese (26%) with almost equally high prevalences of parasitic infection (38% geohelminth and 15% *Giardia lamblia*). In addition, 14% of the children were stunted. In more than one in four households (26%) we found an overweight adult together with a stunted child. Members of such a dual burden household were 2.05 times more likely to have intestinal parasites, a result that was statistically significant [Confidence Interval (CI) = 1.03-4.09] and remained true both for geohelminth infection OR = 1.90, CI = 1.02-3.53 and *G. lamblia*: OR = 2.35, CI = 1.04-5.31.

**CONCLUSIONS** This cross sectional study shows that parasitic infection is strongly associated with the dual burden of adult overweight/obesity and childhood stunting, pointing to a triple burden of disease in this community in Venezuela. While the relationship between parasitic infection and stunting has been well established, the association of intestinal parasite infection with overweight/obesity in adults needs to be explored further.

**1.3-050****Evaluation of cutaneous leishmaniasis in patients referred to pasteur institute of Iran**

M. Farahmand, H. A. Shirazi, H. Nahrevanian and S. Naeimi  
Pasteur Institute of Tehran, Iran

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a widespread tropical infection which has a high incidence rate in Iran. *Leishmania tropica*, the causative agent of anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL), and *L. major*, which causes zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL), are endemic in various parts of Iran with a high incidence rate. The aim of this study was to evaluate the reappraisal of the diagnosis and epidemiology of CL in Iran, by different clinical, parasitological and molecular assays among patients suspected of CL referred to the Department of Parasitology, at the Pasteur Institute of Iran during 2006-2009. Two hundred samples from patients with ulcerative skin lesions were collected, clinical analyses were applied, data questionnaire was completed and samples were examined for CL by using both direct microscopic and culture methods. Moreover, PCR assay was applied for detection of *Leishmania* species in CL isolates resulting from parasitological assay. Of 200 patients, *Leishmania* body was observed in 77 samples (38.5%) by direct smear and 40% by cultivation assay. Most patients (21.3%) had a travel history to Isfahan province, one of the most important endemic areas of CL located in center of Iran. PCR assay by kDNA indicated 32 and 18 of 50 isolates respectively had similar patterns with standard *L. major* and *L. tropica*. In conclusion, clinical manifestations and an appropriate diagnostic assay with a parallel molecular characterization of CL may lead to a screening evaluation of disease, prognosis, treatment and control strategies.

**KEYWORDS** parasitological analysis, molecular biology, leishmaniasis, cutaneous, Iran, epidemiology

**1.3-051*****Leishmania infantum* infection induces in its later stage severe nuclear degeneration of the host cell**

X. F. Busquets<sup>1,4</sup>, A. Pujol<sup>2</sup>, C. Riera<sup>3</sup>, R. Fita<sup>3</sup>, J. Estelrich<sup>2,4</sup> and I. Molina<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC) and Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB); <sup>2</sup>Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona (UB); <sup>3</sup>Departament de Físicoquímica, Facultat de Farmàcia, UB; <sup>4</sup>Institut de Nanociència i Nanotecnologia, UB (IN2UB); <sup>5</sup>Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona

**INTRODUCTION** A number of works have reported on the encapsulation in liposomes of drugs against *Leishmania* as a strategy to increase efficacy and decrease unspecific toxicity, but a few knowledge gaps still obscure some of the subcellular processes underlying this effect.

**METHODS AND MATERIALS** Peritoneal macrophages were obtained after stimulation of female Swiss mice with sodium thioglycolate, seeded in a chamber slide system and incubated for 24 h. The medium was then removed and a late stationary phase promastigote culture of the *L. infantum* strain MCAN/ES/92/BCN503 was added in RPMI medium. The culture was incubated for a further 24 h and then washed to eliminate free promastigotes. After addition of liposomes containing quantum dots (QDs) followed by 1-h incubation, confocal microscopy was used to observe liposomes, lysosomes, nuclei, *Leishmania*, and phagosomes.

**RESULTS** QD fluorescence could be observed inside the cells as whole internalized liposomes 30 min after the addition of liposomes to macrophages. Colocalization analysis of QDs and lysosomes revealed that internalized liposomes fuse with lysosomes. In the early stages of infection single promastigotes can be observed inside the phagosome, whereas lysosomes are still scattered throughout the cell. In those macrophages where *Leishmania* has replicated, lysosomes are absent from the cytosol and their specific fluorescence is strongly localized inside the phagosome where the parasite has already divided, but not in those containing only one amastigote. In later stages, when the parasite has multiplied several times, we have observed strong staining of the macrophage nucleus with dansyl-cadaverine, a phagosome marker.

**CONCLUSIONS** Lysosomes can be used to target liposomal anti-*Leishmania* drugs towards the parasite-containing phagosomes. Only after intraphagosomal replication of *L. infantum*, phagolysosomal fusion proceeds. *Leishmania* infection induces in its later stages severe nuclear degeneration and possibly apoptosis of the host cell.

This research was supported by grants BIO2008-01184, CSD2006-00012, and 2009SGR-760.

**1.3-052****A serological and molecular study of *Coxiella burnetii* in human, vertebrates and arthropods in Rio de Janeiro, Brazil: preliminary results**

M. A. M. Mares-Guia<sup>1</sup>, T. Rozental<sup>1</sup>, A. R. M. Favacho<sup>1</sup>, A. Guterres<sup>1</sup>, R. Gomes<sup>1</sup>, D. N. P. de Almeida<sup>1</sup>, N. S. Moreira<sup>1</sup>, E. B. Almeida<sup>1</sup>, J. D. Barreira<sup>1</sup>, A. L. Santana<sup>2</sup> and E. R. S. Lemos<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil; <sup>2</sup>Secretaria Municipal de Saúde de Itaboraí, Rio de Janeiro, Brasil

**INTRODUCTION** The study was conducted after the occurrence of the first Q fever case confirmed by polymerase chain reaction (PCR), in Itaboraí municipality, Rio de Janeiro State, Brazil. An epidemiological investigation was carried out at two steps: (i) the

## Abstracts of the 7th European Congress on Tropical Medicine and International Health

samples of patient's family and pets living at the patient's house were collected, (ii) the inquiry was made in the property to where the goats were transferred; animal handler's family and pets samples were taken to investigate *Coxiella burnetii* infection.

**METHODS** Blood samples from the family and domestic animals as well as milk, faeces, vaginal, nasal and fecal mucus samples of goats and arthropods were collected. Serum samples collected in the two stages of the study were tested for antibodies anti-*C. burnetii* phases I and II, using a commercial indirect immunofluorescence assay (IFA) for IgG (PANBIOTM); cut-off titer at 64. DNA extracted from all samples was tested for the presence of *C. burnetii* using a PCR targeting the heat shock protein (hspAB) gene.

**RESULTS AND CONCLUSIONS** At step one of the study, the patient's wife and two of 13 dogs showed reactivity to phase II at titer 128 and 64, respectively. At step 2, blood samples from patient's family and animals, except goats, were tested to IFA and not showed reactivity. All blood samples were negative to PCR. A pool of arthropods, collected from a horse, identified as *Amblyomma cajennense*, showed expected amplicon size (687 bp) as also six milk samples from seven adult goats and one anal swab. Only two of the three milk samples were analyzed, and nucleotide sequence of the amplicon generated showed 99% identity to the homologous sequence of the *C. burnetii* transposon gene deposited at Genbank. This study revealed the circulation of *C. burnetii* in Itaborai municipality and the goats are probably involved in this outbreak.

**1.3-053****Help-seeking for pre-ulcer and ulcer conditions of buruli ulcer disease in Ghana**

M. Ackumey<sup>1,2,3</sup>, M. Gyapong<sup>1,4,5</sup>, M. Pappoe<sup>1</sup> and M. G. Weiss<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>School of Public Health, University of Ghana; <sup>2</sup>Swiss Tropical and Public Health Institute, Basel, Switzerland; <sup>3</sup>University of Basel, Switzerland; <sup>4</sup>Dodowa Health Research Unit, Ghana Health Services; <sup>5</sup>Ministry of Health, Ghana

**BACKGROUND** Since the mode of Buruli ulcer (BU) transmission is unknown, public health programmes in affected countries encourage early medical treatment to alleviate suffering and avoid disabilities. Studies of affected persons are required to highlight the influence of social, cultural, economic and behavioural factors on help-seeking (HS) and delays in medical treatment. This study examined socio-cultural features of help-seeking for BU-affected persons with pre-ulcers and ulcers in an endemic area of Ghana.

**METHODS** A sample of 181 respondents, were purposively selected from three BU treatment centres and 67 endemic communities. The Fisher's exact test was used to compare HS variables for pre-ulcers and ulcers. A two-sample test for proportions was used to compare the perceived effectiveness of treatment from different providers. Qualitative phenomenological analysis of narratives clarified the meaning and content of selected quantitative HS variables.

**RESULTS** For pre-ulcers, herbal dressings were placed on affected body parts to expose necrotic tissues and subsequently used as dressings for ulcers. Analgesics and left-over antibiotics were used to ease pain and reduce inflammation. Respondents were more likely to seek medical care for ulcers (62.4%,  $P = 0.001$ ) than pre-ulcers (16.6%). Choices for outside-help were influenced by the perceived effectiveness of the treatment, the closeness of the provider to residences and the influence of family and friends. Herbal treatment was easily accessible since most herbalists were itinerant and family members.

**CONCLUSION** Health education is required to emphasise the risk of self-medication with antibiotics, the importance of medical treatment for pre-ulcers, and to caution against the use of herbs to expose necrotic tissues which could lead to co-infections. Access to medical treatment should be improved to encourage early medical care. Since herbalists contribute to delay in seeking medical care, their role as health educators and advocates for early medical treatment should be explored.

**1.3-054****An outbreak investigation of visceral leishmaniasis among urban residents of Dharan town, eastern Nepal**

S. Uram<sup>1</sup>, E. Hasker<sup>2</sup>, L. Roy<sup>1</sup>, F. Meheus<sup>2</sup>, M. Lal Das<sup>1</sup>, N. R. Bhattarai<sup>1</sup>, M. Boelaert<sup>2</sup> and S. Rijal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>B.P. Koirala Institute of Health Sciences, Dharan, Nepal; <sup>2</sup>Department of Public Health, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium

**INTRODUCTION** Visceral Leishmaniasis (VL) is a predominantly rural disease, common in the lowlands of Nepal. Since 1997, VL has also been reported from the city of Dharan. We investigated risk factors for VL among residents of Dharan town.

**METHODS** We conducted an outbreak investigation including a case-control study; cases were all urban residents treated for VL between 2000 and 2008 at BPKIHS. Controls were healthy persons with no previous history of VL and were selected from a census list frequency-matched for age. Cases and controls were interviewed in their homes with a structured questionnaire. A multilevel model with ward (neighborhood) as random effect was used in the data analysis.

**RESULTS** A total of 158 VL cases and 448 controls were enrolled. The distribution of cases was clustered with 70% of cases vs. 32% of controls resident in three out of 19 wards. Proximity to other VL cases was a strong risk factor (OR 4.8, 95% CI 2.6-8.6). Other associated factors were: 'Blood transfusion' (OR 3.6, 95% CI 1.4-9.1), 'Regular forest visits' (OR 2.9, 95% CI 1.7-5.1), 'Daily wage earner' (OR 2.5, 95% CI 1.4-4.4), 'Earthen floors' (OR 2.2, 95% CI 1.1-4.4). Sleeping on a bed (OR 0.31, 95% CI 0.13-0.78), ownership of cattle (OR 0.11 95% CI 0.01-0.92) and 'Socio-economic status' (OR 0.01, 95% CI 0.001-0.05, for richest vs. poorest quartile) were protective factors against VL.

**CONCLUSION** The distribution of VL was strongly clustered; proximity to other VL cases was a strong risk factor as were housing conditions. All of this suggests local transmission of VL in Dharan town, but requires further entomological evidence. The association between VL and blood transfusion could be due to reverse causality.

**1.3-055****Study of the *Leishmania infantum* metacaspase**

L. Paloque, M. Casanova and N. Azas

Laboratoire de Parasitologie, Mycologie médicale, Hygiène et Zoologie, Université de la Méditerranée, Faculté de Pharmacie, Marseille, France

*Leishmania* are flagellated protozoan parasites of the Trypanosomatidae family. They cause leishmaniasis which are responsible for approximately 60,000 deaths each year. The WHO considers the leishmaniasis as one of six priority diseases of the research program on tropical diseases. The medical importance of these parasites and the lack of really satisfactory treatment lead to the urgent need of new therapeutics and of the discovery of new therapeutic targets. In this purpose, but also to better understand the biology of this parasite, we are interested in a key process: programmed cell death. Contrary to mammals, *Leishmania* do not possess caspases, key enzymes of mammalian apoptosis. However *Leishmania* express metacaspases, peptidases related to caspases in terms of amino acid sequence, structure and characteristic catalytic

## ANEXO 6



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
 FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
 INSTITUTO OSWALDO CRUZ  
 DEPARTAMENTO DE VIROLOGIA

**LABORATÓRIO DE HANTAVIROSES E RICKETTSIOSES**

**Laboratório de Referência Nacional para Rickettsioses  
 Laboratório de Referência Regional para Hantavírus**

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (pequenos animais)**

Com o objetivo de avaliar a circulação de Rickettsioses e Hantavírus no Estado do Rio de Janeiro, eu \_\_\_\_\_ fui convidado a participar de um estudo que irá avaliar a presença de bactérias e vírus que pode causar doenças em animais domésticos como também no homem. A participação no estudo envolverá uma consulta veterinária e a coleta de cerca de 3 a 5 ml de sangue venoso periférico do meu animal de estimação \_\_\_\_\_, para estudo das infecções por *Bartonella*, *Rickettsia rickettsii*, *Coxiella burnetii*, *Ehrlichia* spp e pelos vírus transmitidos por roedores como hantavírus e arnavírus. Minha participação no estudo é totalmente voluntária, podendo ser interrompida a qualquer momento, e sem nenhuma forma de compensação financeira. Fui informado ainda que receberei os resultados dos exames. Autorizo ainda que amostras de sangue do meu animal de estimação sejam conservadas pelo Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses da Fundação Oswaldo Cruz para estudos futuros, desde que estes venham a ser autorizados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz.

Caso tenha alguma dúvida ou necessidade de qualquer esclarecimento sobre o estudo, você pode entrar em contato com os pesquisadores relacionados abaixo:

Dr<sup>a</sup> Elba Lemos  
 Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses  
 Pavilhão Hélio e Peggy Pereira 1º Pavimento, Sala B116 - Av. Brasil 4350- Rio de Janeiro  
 FioCruz- Tel. 2562-1897

Rio de Janeiro, de de 20\_\_.  
 \_\_\_\_\_ assinatura