

Febre Q: do diagnóstico à investigação ecoepidemiológica de *Coxiella burnetii* no contexto da infeção humana

Ana Sofia Santos; em nome da equipa do projeto Febre Q

ana.santos@insa.min-saude.pt

Laboratório Nacional de Referência de Doenças Infecciosas Transmitidas por Vetores.
Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac.
Departamento de Doenças Infecciosas, INSA (Águas de Moura).

_Introdução

A febre Q (do original *Query fever*) é uma zoonose de distribuição mundial, com crescente interesse na Europa. Causada por uma Gammaproteobacteria - *Coxiella burnetii* – esta é uma doença complexa e polimórfica que pode manifestar-se na forma aguda autolimitada, com um curso ligeiro a moderado e prognóstico benigno, como na forma persistente ou crónica, geralmente localizada e de evolução grave ou potencialmente fatal (1). A febre Q tanto ocorre como casos isolados, como no contexto de surtos, alguns com importantes implicações em saúde pública, como o verificado recentemente na Holanda (2007-2009) (2).

Em Portugal, os primeiros registos de casos de infeção por *C. burnetii* surgiram em meados do século XX, tendo a febre Q passado a integrar a lista das Doenças de Declaração Obrigatória (DDO) desde 1999 (3). A febre Q é considerada endémica no continente, com o maior número de casos notificados na região Centro e Sul (3). Apesar dos dados oficiais apontarem para uma baixa incidência (0,11 casos por 10⁵ habitantes em 2008 (3)), esta é uma doença subnotificada. Num trabalho realizado pelo Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac (CEVDI) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge em colaboração com a Direção-Geral da Saúde entre 2004-2009, foi possível demonstrar que o número de casos com confirmação laboratorial ultrapassou em mais do dobro as notificações clínicas registadas no sistema DDO em igual período de tempo (4). Acresce ainda, a circunstância da infeção poder passar despercebida, quer por ocorrer de forma assintomática (que se estima em 50% das situações (1)), quer pela inespecificidade do quadro clínico e ausência de contexto epidemiológico, como foi comprovado no primeiro isolamento

de *C. burnetii* obtido no CEVDI a partir de uma amostra biológica de um doente cuja suspeita clínica não incluía febre Q (5).

_Objetivo

A escassa informação disponível sobre o panorama etiológico e padrão epidemiológico nacional da febre Q, face ao seu crescente interesse no contexto europeu, levou à submissão de um projeto de investigação sobre o tema, que teve início em abril de 2011 com o apoio da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (ref^a PTDC/SAU-SAP/115266/2009). Constituíram objetivos principais do estudo: 1) analisar os casos de febre Q para melhor caracterizar o contexto epidemiológico e clínico da doença aguda e crónica; 2) caracterizar a diversidade genética do agente etiológico como potencial fator de virulência; 3) obter uma coleção de isolados de *C. burnetii* da população portuguesa e caracterizar o padrão de suscetibilidade aos antibióticos; 4) averiguar potenciais fatores de risco associados à transmissão de *C. burnetii* em Portugal. Neste artigo são resumidos os principais resultados obtidos até ao momento.

_Material e métodos

Para a determinação do título de anticorpos das classes G, M e A anti-*C. burnetii* em fase I e fase II em amostras de plasma/soro foi utilizada imunofluorescência indireta (6-9). Protocolos de PCR nested e/ou PCR em tempo real com alvo molecular no elemento de inserção *IS1111* foram usados na deteção de ADN do agente em biopsias e necropsias (hepática, esplénica, pulmonar, renal, osteoarticular, valvular, uterina, placentária), bem como em outros produtos biológicos (sangue, fezes, expetoração ou lavado-bronco alveolar, sêmen, leite, exsudados vaginais e cloacais), ixodídeos e amostras de água (6-14). As amostras recebidas para diagnóstico direto, que não foram previamente processadas e que eram viáveis para isolamento do agente, foram ainda inoculadas em células macrófágicas de crescimento contínuo *in vitro* - DH82 (ATCC CRL-10389) recorrendo à técnica de *shell vial* (10). A genotipagem das amostras PCR-positivas e dos isolados obtidos foi realizada tanto por MST (*Multilocus sequence typing*) como por MLVA (*Multiple Loci VNTR Analysis*), respetivamente com a análise de 10 e 6 *loci* (10,13). A suscetibilidade das estirpes de *C. burnetii* (grupos genómicos) à doxiciclina foi ainda investigada com base na análise da concentração mínima inibitória, calculada com recurso a PCR quantitativo em tempo real com alvo no gene *sodB*.

Resultados e discussão

No âmbito deste projeto foram investigados 247 casos de febre Q, dos quais 232 (93,9%) apresentaram um quadro clínico de infeção aguda à data do diagnóstico e 15 (6,1%) eram doentes crónicos (tabela 1). Todos os casos foram confirmados pelo CEVDI no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2013. Da análise dos dados dos doentes com informação clínica disponível, pode-se verificar que em Portugal há coexistência das três manifestações clínicas principais que caracterizam o quadro agudo da febre Q (febre, hepatite e pneumonia), embora com dominância da doença febril sem foco (44,8%), com envolvimento hepático (25,3%) ou pulmonar (17,5%), sendo raro ocorrerem em simultâneo (3,2%) (tabela 1) (7). À semelhança do que está descrito na literatura, a

doença é mais comum no género masculino e em adultos na idade ativa (1). Foi ainda possível identificar quadros clínicos raros da infeção aguda em 4 doentes, como são exemplo a meningoencefalite (1 caso) e a pericardite (3 casos) (7). Contudo, o facto mais interessante deste grupo de doentes portugueses com infeção aguda foi o envolvimento renal com insuficiência aguda transitória, por vezes com necessidade de suporte mecânico, registado em alguns doentes (7,10). Estas são situações que estão ainda a ser alvo de investigação, tendo em vista o isolamento e caracterização das estirpes envolvidas, uma vez que aparentemente contrastam com o descrito na literatura, em que o envolvimento renal está apenas associado às infeções crónicas por *C. burnetii* (15).

Tabela 1: Características demográficas e apresentação clínica dos casos de febre Q diagnosticados entre 2004-2013.

	Febre Q	
	Casos de infeção aguda (n=232)	Casos de infeção crónica (n=15)
	n (%)	n (%)
Género masculino	173 (74,6)	12 (80)
Idade (mediana)	44 anos	50 anos
Sem informação clínica	78 (33,7)	-
Com informação clínica	154 (66,4)	15 (100)
Febre	69 (44,8)	-
Hepatite	39 (25,3)	-
Pneumonia	27 (17,5)	-
Hepatite e pneumonia	5 (3,2)	-
Pericardite	3 (1,9)	-
Meningoencefalite	1 (0,7)	-
Outra	10 (6,5)	-
Endocardite	-	9 (60,0)
Endocardite e hepatite	-	2 (13,3)
Endocardite e IRC*	-	2 (13,3)
Osteomielite	-	2 (13,3)

* IRC - Insuficiência renal crónica

artigos breves_ n. 5

No período em estudo, foram identificados doze novos casos crónicos e seguidos três outros, já previamente diagnosticados (6-9). Na grande maioria estes doentes apresentaram um quadro clínico de endocardite (n=9), menos frequentemente associado a hepatite (n=2) ou a insuficiência renal crónica (IRC) (n=2) (tabela 1) (7,8). Foi ainda possível identificar dois casos pediátricos de osteomielite (9). O envolvimento osteoarticular, embora mais frequente em crianças, é uma das manifestações raras de doença crónica existindo apenas cerca de duas dezenas de casos descritos a nível mundial (9). A dificuldade na identificação do foco de infeção e a ausência de confirmação laboratorial definitiva (i.e. com isolamento ou deteção do ADN do agente) deixou ainda em aberto a possibilidade de ocorrerem outros quadros clínicos na infeção crónica por *C. burnetii* em Portugal, nomeadamente a infeção vascular. Nestas situações poderá ser particularmente útil o recurso a meios imagiológicos com localização de zonas inflamatórias, como é o caso do PET-Scan (16). O avanço registado no diagnóstico laboratorial da infeção por *C. burnetii* tem vindo a contribuir para um melhor conhecimento da patologia com a identificação de novos quadros clínicos (17, 18).

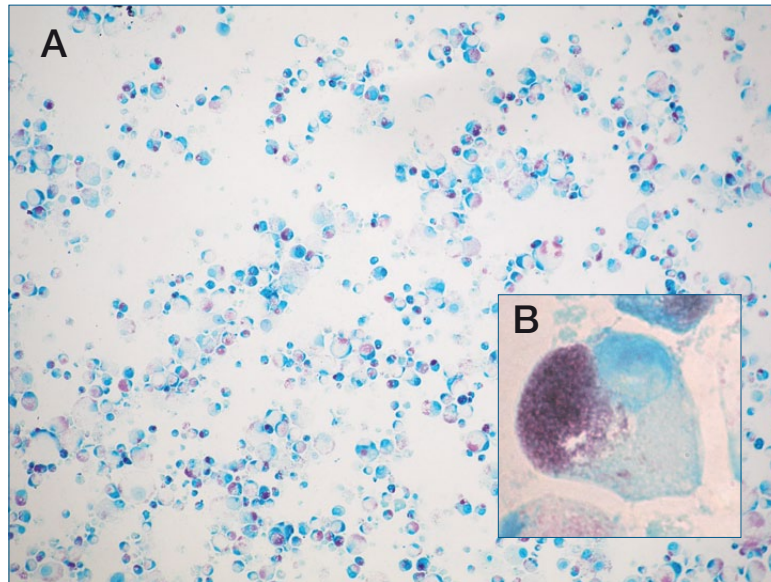
No contexto da investigação ecoepidemiológica foram processadas e analisadas, por PCR, 3.800 amostras provenientes de 1.545 vertebrados, 2.051 ixodídeos e 86 águas de furos artesanais usados para consumo doméstico. A presença de ADN de *C. burnetii* foi confirmada na maioria dos grupos estudados, com exceção dos animais de companhia, espécies cinegéticas e amostras de água (11, 12, 14). A frequência mais elevada de infeção por *C. burnetii* observou-se nas espécies pecuárias, em particular nos caprinos (tabela 2) (13). Este foi um grupo que integrou ruminantes domésticos com transtornos reprodutivos e cujas amostras foram estudadas como casos suspeitos de brucelose e clamidiose, tendo *C. burnetii* sido identificada tanto em infeções de etiologia singular como em coinfeções com *Chlamydophila* spp (13). Os resultados obtidos vêm assim alertar para a importância veterinária deste agente, raramente considerado perante um quadro clínico compatível, como o referido. Fica ainda demonstrado que *C. burnetii* apresenta também em Portugal um amplo espectro de hospedeiros, incluindo mamíferos, aves e ixodídeos (11, 12). Nestes últimos, a deteção de ADN do agente etiológico, sobretudo em exemplares obtidos a parasitar animais silvestres ou em áreas com abundante fauna silvestre (11), reitera o papel que tradicionalmente é atribuído aos ixodídeos na manutenção dos ciclos silváticos de *C. burnetii* (1).

Tabela 2: Pesquisa de ADN de *C. burnetii*.

Amostras	Nº positivos/total
Espécies pecuárias*	
Bovinos	5/39
Caprinos	15/78
Ovinos	8/98
Suínos	1/1
Animais companhia	
Gatos	0/173
Cães	0/124
Exóticos	0/41
Animais em cativeiro*	
Antílopes	2/12
Girafa	1/1
Rinoceronte	0/1
Zebras	0/2
Caça	
Veados	0/34
Javalis	0/15
Corços	0/5
Animais silvestres	
Mamíferos de médio-porte**	7/67
Roedores	9/323
Aves	13/514
Ixodídeos	
Vegetação	8/150
Parasitar cães	5/936
Parasitar o Homem	0/445
Vegetação/hospedeiros diversos	34/260
<i>Rhipicephalus bursa</i>	0/260
Ambientais/Alimentares	
Água de furos	0/86
Leite de animais com suspeita clínica	2/17
Leite comercial	9/9
Total	119/3691

* Animais com transtornos reprodutivos ** Animais mortos por atropelamento

Figura 1: ⬇ Isolado de *C. burnetii* em células DH82.



Coloração de Giménez observada com uma ampliação de 100X (A) e com uma ampliação de 1000X, objetiva de imersão (B).

No decurso do projeto foram ainda realizados 185 ensaios de isolamento, utilizando sobretudo amostras de sangue mas também material valvular e abortivo, o que resultou em 14 novos isolados, que se somaram aos seis já existentes no início da investigação (figura 1). Esta coleção, composta por 17 isolados de humanos e três de animais, é tanto quanto se sabe, a única existente atualmente em Portugal e está a servir de base ao estudo de suscetibilidade aos antibióticos que está a decorrer.

A genotipagem dos isolados obtidos e das amostras PCR-positivas permitiram a identificação de quatro grandes grupos genómicos: MST 4 (correspondendo aos génotipos MLVA U, V, W, X, Y, CN, CO, CP), MST 20 (MLVA I), MST 8 (MLVA T e CM) e MST 13 (MLVA S) (10, 13). Estes resultados comprovaram a existência de uma heterogeneidade genética característica de evolução natural do agente e na ausência de surtos. As variantes identificadas são comuns às encontradas noutros países europeus da bacia do Mediterrâneo, tais como Espanha e França (10, 13). Em termos de contexto zoonótico, foi ainda possível relacionar as variantes identificadas em pequenos ruminantes e classificadas como MST 8 (MLVA T) e MST 13 (MLVA S), às identificadas nos casos humanos com evolução crónica (10). A genotipagem de mais amostras contribuirá certamente para melhor esclarecer esta provável relação. Os resultados obtidos são contudo concordantes com o que está descrito na literatura, que atribui aos ruminantes domésticos um papel de relevo na epidemiologia da febre Q (1).

_Conclusão

A investigação realizada neste projeto veio alertar para o facto da infeção por *C. burnetii* ser um problema médico e veterinário que está longe de ser negligenciável em Portugal, à semelhança do que acontece em outros países europeus com características edafoclimáticas, ecológicas e pecuárias similares às portuguesas. Este é, sem dúvida, um tema incontornável em saúde pública tendo a atualização da informação ecoepidemiológica e nosológica nacional contribuído para uma avaliação integrada da situação da febre Q na Europa. Uma maior sensibilização para a ocorrência de infeções por *C. burnetii* nos animais de produção e a sua inclusão no diagnóstico diferencial da doença abortiva, será um passo importante na prevenção da contaminação ambiental e, conseqüentemente, na redução de casos de infeção, tanto na população humana como na animal.

Agradecimentos

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia pelo financiamento do projeto Febre Q (PTDC/SAU-SAP/115266/2009). Aos projetos MOVE, Merial, LIFE *Habitat Lince Abutre* (LIFE08 NAT/P/000227), *Rhipicephalus bursa* (PTDC/CVT-EPI/4339/2012) e REVIVE, entre outras colaborações, pelas amostras disponibilizadas. À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo

Referências bibliográficas:

- (1) Santos AS, Bacellar F, França A. Febre Q: revisão de conceitos. Rev Port Med Interna. 2007;12(2):90-9. http://www.spmi.pt/revista/vol14/vol14_n2_2007_090_099.pdf
- (2) Roest HI, Tilburg JJ, van der Hoek W, et al. The Q fever epidemic in The Netherlands: history, onset, response and reflection. Epidemiol Infect. 2011;139(1):1-12.
- (3) Direção-Geral da Saúde. Doenças de Notificação Obrigatória (1999 a 2013). www.dgsaude.pt.
- (4) Santos AS, De Sousa R, Luz T, et al. Four years of Q fever diagnosis in a State Laboratory, Portugal. In: ESCAIDE - European Scientific Conference on Applied Infectious Disease Epidemiology. Lisbon, 11-13 Nov. 2010: abstract book, p. 178. Poster. http://ecdc.europa.eu/en/ESCAIDE/Documents/ESCAIDE2010_abstract_book.pdf
- (5) Santos AS, de Sousa R, Alves F, et al. Isolation of Coxiella burnetii from the blood of a patient with positive Anaplasma phagocytophilum serological results. Clin Microbiol Infect. 2009;15(Suppl 2):192-3. www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14635412
- (6) Santos AS, Sousa R, Baltazar N, et al. Diagnostic dilemmas of chronic Q fever: Data from Portuguese case. In: 6th International Meeting on Rickettsiae and Rickettsial Diseases, 5-7 Jun. 2011: abstract book, p. 62. Poster.
- (7) Santos AS, De Sousa R, Luz T, et al. Febre Q: a experiência de dez anos de diagnóstico laboratorial. Saúde em números. 2014; 3:104 (IV Congresso Nacional de Saúde Pública, 2-3 out. 2014: resumos). Poster. www.dgs.pt/paginas-de-sistema/saude-de-a-a-z/revista-da-dgs.aspx
- (8) Boattini M, Almeida A, Moura RB, et al. Chronic Q fever with no elevation of inflammatory markers: a case report. Case Rep Med. 2012;2012:249705. www.hindawi.com/journals/crim/2012/249705/
- (9) Costa B, Morais A, Santos AS, et al. Q Fever Chronic Osteomyelitis in Two Children. Pediatr Infect Dis J. 2015;34(11):1269-71.
- (10) Santos AS, Tilburg JJ, Botelho A, et al. Genotypic diversity of clinical Coxiella burnetii isolates from Portugal based on MST and MLVA typing. Int J Med Microbiol 2012;302(6):253-6.
- (11) Santos AS, Velez R, Raposo Duarte R, et al. Coxiella burnetii and Anaplasma phagocytophilum in ticks collected from wild animals, Portugal. In: International Congress on Rickettsia and other Intracellular Bacteria, 13-16 Jun. 2015: abstract book, p.168. Poster.
- (12) Santos AS, Amaro F, Norte AC, et al. Detection of Coxiella burnetii in rodents and wild birds in Portugal. In: International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance, 31 Oct.-3 Nov. 2014: abstract book, p. 150. Poster.
- (13) Cumbassa A, Barahona MJ, Cunha M, et al. Coxiella burnetii DNA detected in unsuspected domestic ruminants and wildlife from Portugal. Vet Microbiol. 2015;180(1-2):136-41.
- (14) Raposo Duarte L, Alves MM, Santos AS. Pesquisa de Coxiella burnetii em animais de companhia. In: 3º Congresso Nacional de Medicina Tropical/1º Congresso Lusófono de doenças transmitidas por vectores, 20-21 abr.-2015. Livro de resumos, p. 59. Poster.
- (15) Kampschreur LM, Dekker S, Hagenaars JC, et al. Identification of risk factors for chronic Q fever, the Netherlands. Emerg Infect Dis 2012;18(4):563-70. wwwnc.cdc.gov/eid/article/18/4/11-1478_article
- (16) Raoult D. Chronic Q fever: expert opinion versus literature analysis and consensus. J Infect. 2012;65(2):102-8.
- (17) Million M, Thuny F, Bardin N, et al. Acute Q fever endocarditis with anti-phospholipid antibodies: na emerging clinical entity. In: International congresso on Rickettsia and other intracelular bacteria, 13-16 Jun. 2015: abstract book, p. 84. Poster.
- (18) Polo MF, Arcadu A, Mastandrea S, et al. Pulmonary inflammatory related to Q fever pneumonia. In: International congresso on Rickettsia and other intracelular bacteria, 13-16 Jun. 2015: abstract book, p. 80. Poster.