

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina de Lisboa**



“Estudo da prevalência de anticorpos anti – *Coxiella burnetii*
numa amostra de dadores de sangue de uma região portuguesa”

Paulo Alexandre Vidal Parreira

Mestrado em Doenças Infecciosas Emergentes (3ª Edição)

2008

**A impressão desta dissertação foi aprovada
pela Comissão Coordenadora do Conselho
Científico da Faculdade de Medicina de
Lisboa em reunião de 18 de Março de 2008**

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina de Lisboa**



“Estudo da prevalência de anticorpos anti – *Coxiella burnetii*
numa amostra de dadores de sangue de uma região portuguesa”

Paulo Alexandre Vidal Parreira

Mestrado em Doenças Infecciosas Emergentes (3ª Edição)

Dissertação orientada pela Doutora Fátima Bacellar
Dissertação co-orientada pela Professora Doutora Emília Valadas

**Todas as afirmações efectuadas no presente documento
são da exclusiva responsabilidade do seu autor, não
cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de
Medicina de Lisboa pelos conteúdos nele apresentados**

Aos meus pais, obrigado pelo vosso esforço

À Susana, sempre teu e para sempre a teu lado

Agradecimentos

Ao **Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge**, na pessoa do Presidente **Professor Doutor Pereira Miguel** e do ex-Director **Dr. Fernando de Almeida** pelos meios disponibilizados para a realização da componente laboratorial deste trabalho.

Ao **Centro Regional de Lisboa do Instituto Português de Sangue**, na pessoa da **Dr.ª Gracinda de Sousa** pela cedência das amostras para estudo, pela celeridade e disponibilidade da sua colaboração.

Ao **Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas**, na pessoa da **Doutora Sofia Núncio** pela disponibilização das instalações, materiais e equipamentos do centro.

Ao **Professor Doutor Francisco Antunes**, coordenador do mestrado em “Doenças Infecciosas Emergentes” (3ª Edição), pelos conhecimentos superiormente transmitidos durante a frequência do mesmo.

À **Doutora Fátima Bacellar**, Investigadora Principal Aposentada do INSA, orientadora que acompanhou sempre, com uma disponibilidade inigualável para ler, corrigir, sugerir e motivar para o objectivo.

À **Professora Doutora Emília Valadas**, co-orientadora cujas sugestões, conselhos e correcções foram sempre muito pertinentes.

À **Doutora Ana Sofia Santos** pelo apoio prestado na observação microscópica, troca de ideias, conselhos, correcções e sugestões.

Ao **Dr. António Santos** do Gabinete de Mestrados e Doutoramentos da FML pela sua disponibilidade e prontidão na resolução das contrariedades burocráticas.

A todos os colegas do **CEVDI** pelo apoio manifestado ao longo do tempo.

A todos os **colegas** da 3ª Edição do Mestrado em “Doenças Infecciosas Emergentes” que tal como eu, abraçaram este desafio.

À minha **família e amigos** que sempre me apoiaram e entenderam, o meu obrigado pela motivação.

À **Prestifarma**, nas pessoas do **Dr. Pedro Vilas** e do **Dr. Pedro Peixe**, pela oferta de reagentes que tornou este trabalho possível.

ÍNDICE

	Página
RESUMO / ABSTRACT	v
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	viii
I – INTRODUÇÃO	1
II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. História	3
2. Características microbiológicas e Taxonomia do agente	7
2.1 Variação antigénica	10
3. Epidemiologia	12
4. <i>Coxiella burnetii</i> e o Bioterrorismo	16
5. Manifestações clínicas da infecção	18
5.1 Febre Q aguda	18
5.2 Febre Q crónica	22
6. Métodos de Diagnóstico Laboratorial	24
6.1 Métodos de diagnóstico directo	24
6.2 Métodos de diagnóstico indirecto	28

7. Tratamento	32
7.1 Tratamento da infecção aguda	32
7.2 Tratamento da infecção crónica	33
8. Prevenção	36
9. A febre Q em Portugal	40
10. A Dádiva de sangue em Portugal	44
III – OBJECTIVOS	50
IV - MATERIAL E MÉTODOS	54
1. Selecção da amostra	54
2. Escolha de região a estudar	54
3. Dimensão da amostra	55
4. Constituição da amostra	55
5. Processamento e identificação das amostras	57
6. Procedimento	57
7. Reagentes	58
8. Diluição das amostras	60
9. Procedimento para a execução da técnica de imunofluorescência indirecta	61
10. Observação microscópica	63

V – RESULTADOS

1 - Soros de Lisboa	65
1.1- Resultados finais para o Distrito de Lisboa	68
1.1.1 - Ig G,A,M na diluição 1/50	68
1.1.2- Ig G,A,M na diluição 1/100	68
1.1.3 - IgG (Titulações)	68
1.1.4- IgM (Titulações)	68
2 - Soros de Setúbal	
2.1 - Resultados Finais para o Distrito de Setúbal	72
2.1.1 - Ig G,A,M na diluição 1/50	72
2.1.2 - Ig G,A,M na diluição 1/100	72
2.1.3 - IgG (Titulações)	72
2.1.4 - IgM (Titulações)	72
3 - Soros de Santarém	
3.1 - Resultados Finais para o Distrito de Santarém	75
3.1.1 - Ig G,A,M na diluição 1/50	75
3.1.2 - Ig G,A,M na diluição 1/100	75
3.1.3 - IgG (Titulações)	75
3.1.4- IgM (Titulações)	75

4- Resultados Totais	76
4.1- Ig G,A,M na diluição 1/50	76
4.2- Ig G,A,M na diluição 1/100	76
4.3- IgG (Titulações)	76
4.4- IgM (Titulações)	76
5 - Titulação dos soros positivos na triagem	77
5.1 - Fase I, IgG e IgM	77
5.2 - Fase II, IgG	78
5.3 - Fase II, IgM	78
VI – DISCUSSÃO	79
VII – CONCLUSÃO	82
VIII – BIBLIOGRAFIA	87

RESUMO

A febre Q é uma patologia cujo agente etiológico é a bactéria Gram negativa *Coxiella burnetii*. As suas características colocam-na próxima das Rickettsiales, apesar de recentemente ter sido incluída na ordem Legionellales. A infecção pode apresentar-se sob a forma de doença aguda (na maioria dos casos assintomática) ou evoluir para doença crónica (nos grupos de risco para a infecção pode mesmo provocar a morte). Em Portugal, a febre Q é de declaração obrigatória desde 1999, mas o número de notificações é baixo. O conhecimento sobre a endemicidade do agente é escasso, existindo poucos estudos publicados sobre a realidade no país. Este trabalho visa estudar uma população de 150 dadores de sangue da região de Lisboa e Vale do Tejo, onde o número de notificações de febre Q é mais elevado, de forma a conhecer a seroprevalência para *C. burnetii* nesta população e determinar se o *cut-off* utilizado no Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (CEVDI/INSA) é adequado à população portuguesa. A técnica utilizada foi imunofluorescência indirecta, técnica de referência da Organização Mundial de Saúde para a pesquisa de anticorpos anti - *C. burnetii*. Dos resultados obtidos temos que 64% dos dadores são seronegativos na diluição 1/50 e 71,3% na diluição 1/100. Os restantes 28,7% da população apresentam anticorpos residuais que sugerem contacto anterior com o agente embora um desses dadores apresenta títulos que podem ser classificados como indicativos de febre Q activa. Os resultados obtidos contribuem para uma melhor avaliação do impacto desta infecção na população portuguesa e sugerem que *C. burnetii* é endémica em Portugal. Em função dos resultados obtidos o *cut-off* em

uso no CEVDI poderá ser ajustado, aumentando de 1/50 para 1/100 a diluição de triagem das amostras.

Palavras-chave: Febre Q, *Coxiella burnetii*, Portugal, dadores de sangue, Imunofluorescência Indirecta

ABSTRACT

Coxiella burnetii is a Gram-negative bacterium which causes Q fever in humans. It has similarities with the order Rickettsiales even though it has been recently classified in the order Legionellales. The infection may appear in the form of acute disease (asymptomatic in most cases) or evolve to chronic disease (which can cause death if untreated, especially in the groups at risk). Q fever has been a notifiable disease in Portugal since 1999, but it has a low number of notifications. The knowledge about the agent's endemicity is scarce and there are few studies published in this field of investigation. This thesis aims to study a group of 150 healthy blood donors from the Portuguese region of Lisboa e Vale do Tejo, which is the region with the most notifications of Q fever throughout the years. The objective is to find out the seroprevalence of antibodies to *C. burnetii* in this population and to determine if the cut-off used in the Center for Vectors and Infectious Diseases Research of the National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge (CEVDI/INSA) is adequate for the Portuguese population. The serology was performed using indirect immunofluorescence, which is the reference procedure recommended by the World Health Organization. The results

showed that 64% of the blood donors are seronegative at the first dilution (1/50), percentage that rises to 71.3% if we consider the second dilution studied (1/100). The remaining 28.7% of the blood donors have antibodies against *C. burnetii*, indicating previous exposure to the agent although one of these donors has titers that suggest active Q fever. These results allow for a better understanding of the impact of this infection in the Portuguese population and suggest that *C. burnetii* is endemic in Portugal. These results provide an adjustment to the cut-off used in CEVDI/INSA, changing the screening dilution from 1/50 to 1/100.

Keywords: Q fever, *Coxiella burnetii*, Portugal, blood donors, indirect immunofluorescence

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

ARN – Ácido Ribonucleico

BT – Bioterrorismo

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

CEVDI/INSA - Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

CF -Técnica de Fixação do Complemento

CRS – Centro Regional de Sangue

DDO - Doença de declaração obrigatória

DGS - Direcção Geral de Saúde

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

EUA - Estados Unidos da América

IFI– Imunofluorescência Indirecta

INE – Instituto Nacional de Estatística

LPS - Lipopolissacáridos

IPS - Instituto Português do Sangue

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PCR-RT - *Polymerase Chain Reaction-Real Time*

PBS - Tampão Salino Fosfato pH 7,4

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida

SIH – Serviços de Imunohemoterapia Hospitalar

VHC - Vírus da Hepatite C

VIH - Vírus da Imunodeficiência Humana

I – INTRODUÇÃO

A febre Q é uma zoonose cujo agente etiológico é a bactéria *Coxiella burnetii*. A principal via de transmissão ao Homem é aérea, pela inalação de partículas infectantes. Os principais reservatórios animais são espécies pecuárias, nomeadamente gado ovino, bovino e caprino.

A bactéria apresenta duas variações antigénicas, consoante a composição da parede celular, em termos de lipopolissacáridos (LPS). A fase I é altamente infecciosa, podendo ser encontrada em humanos, animais ou artrópodes infectados naturalmente. A fase II não existe *in vivo*, é menos infecciosa e é obtida laboratorialmente.

A doença pode apresentar-se numa forma aguda auto-limitada, com uma elevada percentagem de infecções assintomáticas, com produção de anticorpos que reagem com a bactéria em fase II ou evoluir para formas crónicas, sendo a endocardite a manifestação clínica mais descrita nestes casos, com produção de anticorpos que reagem com a bactéria em fase I.

A abordagem mais comum para a detecção de anticorpos anti – *C. burnetii* é a técnica de imunofluorescência indirecta, com antígeno em fase I e II.

A doença foi descrita pela primeira vez em 1937 na Austrália. Em Portugal os primeiros casos foram descritos em 1947. O conhecimento da realidade da infecção em Portugal é ainda escasso. A febre Q é uma doença de declaração obrigatória desde 1 de Janeiro de 1999, tendo havido 89 casos notificados até 2006.

Um passo importante para conhecer melhor a realidade da infecção no território nacional é estudar uma população saudável, determinando a sua seroprevalência. Pelas suas características os dadores de sangue são considerados como o modelo de população saudável.

II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. História

Em Agosto de 1935 Sir Raphael Cilento, Director Geral de Saúde e dos Serviços Médicos do Estado de Queensland, na Austrália, pediu a Edward Derrick (que dirigia o Laboratório de Microbiologia e Patologia do Departamento de Saúde de Queensland, em Brisbane, capital do estado) que investigasse um surto de síndromas febris indeterminadas ocorrido entre os trabalhadores do matadouro de Cannon Hill. Com efeito, Cilento informou Derrick que os primeiros casos haviam surgido em 1933 e que não se encaixavam nas entidades nosológicas conhecidas à data⁵⁶.

Derrick começou por descrever minuciosamente o quadro clínico. Constatou que tinha uma duração de sete a vinte e quatro dias e se caracterizava por sintomas bastante inespecíficos, nomeadamente febre, dores de cabeça, mal-estar geral, anorexia e mialgias, entre outros. As hemoculturas realizadas eram negativas e as amostras de soro testadas não detectaram quaisquer anticorpos para gripe, tifo, leptospirose, febre tifóide ou paratifóide. Derrick inoculou cobaias com sangue e urina de doentes infectados e observou que os animais desenvolviam febre. No entanto, não conseguiu isolar o agente causal. Perante este resultado julgou poder tratar-se uma doença viral de natureza indeterminada, denominando-a febre Q, de *query*, termo inglês para dúvida¹⁹. Na tentativa de esclarecer a etiologia da doença, Derrick enviou fragmentos de fígado dos animais inoculados a Macfarlane Burnet, virologista que desenvolvia os seus estudos no Instituto Walter & Eliza Hall, em Melbourne. Burnet e o seu colaborador Mavis Freeman conseguiram isolar organismos de origem bacteriana com

características de natureza semelhante aos membros do género *Rickettsia*⁹, o que concluíram após observação de esfregaços de tecido hepático utilizando a coloração de Castaneda¹². O agente da febre Q passou então a ser designado por *Rickettsia burnetii*. Simultaneamente nos Estados Unidos da América (EUA), estado de Montana, Herald Rea Cox e Gordon Davis que desenvolviam os seus estudos na tentativa de identificar os vectores da febre das Montanhas Rochosas e da tularémia isolaram o agente da febre Q a partir de carraças da espécie *Dermacentor andersoni*. Os investigadores verificaram que as cobaias onde as carraças colhidas na região de Nine Mile Creek se haviam alimentado desenvolveram uma síndrome febril indeterminada. Posteriores inoculações *in vivo* revelaram a inexistência das lesões habitualmente associadas aos agentes das febres exantemáticas. Assim, o agente Nine Mile foi mantido no laboratório apenas por curiosidade científica mas a sua importância e poder patogénico para o homem pouco demorou a ser revelado.. Em Maio de 1938, Rolla Dyer, director do Instituto Nacional de Saúde dos EUA, visitou Cox e cerca de dez dias depois adoeceu com dor retro-orbital, febre, arrepios e suores frios. Ao sexto dia de sintomas foi efectuada uma colheita de sangue, que foi inoculado em cobaias. Os animais desenvolveram febre. Estudos posteriores demonstraram tratar-se do agente Nine Mile, isolado por David a partir de carraças¹⁶. Dyer ciente dos casos ocorridos na Austrália rapidamente estabeleceu o paralelismo entre o agente da febre Q e o da febre Nine Mile²⁴. Em 1948, Cornelius Philip sugeriu que *R. burnetii* fosse a única espécie de um género distinto dentro da família *Rickettsiaceae*, visto que estava demonstrado que este microrganismo possuía características únicas dentro do género *Rickettsia*⁷³. O nome proposto para o género foi *Coxiella*, pertencente à família *Rickettsiaceae*. A partir dessa

data, o agente etiológico da febre Q passou a denominar-se *Coxiella burnetii*, em homenagem simultânea a Burnet e Cox, que desenvolveram os seus estudos em zonas distintas do globo (Austrália e EUA) e muito contribuíram para um melhor conhecimento deste agente. Cox e Burnet faleceram ambos no ano de 1986⁵⁶.

A primeira descrição relativa a febre Q na Europa remonta ao ano de 1943, nos arredores de Atenas (Grécia). Em Portugal os primeiros casos da doença foram descritos por Fernando Fonseca e seus colaboradores a partir de Dezembro de 1947³⁰⁻³¹. Estes investigadores isolaram a partir de amostras biológicas de doentes, seis estirpes de *C. burnetii* (à data ainda denominada de *Rickettsia burnetii*) e procederam às primeiras provas serológicas, com antigénio cedido por Herald Cox⁷⁴.

Em 1989 Maria Regina Mendes e colaboradores apresentaram um estudo retrospectivo sobre a casuística do Serviço de Doenças Infecciosas do Hospital de Santa Maria, em Lisboa. Esse estudo incidiu sobre 176 doentes a quem foi diagnosticada febre Q entre 1974 e 1987⁶².

No mesmo ano, os mesmos autores realizaram ainda um estudo comparativo sobre a seroepidemiologia da febre Q numa população urbana (dadores de sangue e trabalhadores do Hospital de Santa Maria) e numa população considerada de alto risco (trabalhadores do Matadouro de Vila Franca de Xira)⁶³. Concluíram existir uma maior prevalência de anticorpos na população de alto risco (47,9% de positivos) contra 14% de positivos na população urbana (apesar de existir uma ligeira diferença dentro deste grupo, nomeadamente entre população de Lisboa e da periferia, aumentando a prevalência de 8,2% para 23,1%). Ainda em 1989, Germano do Carmo e colaboradores apresentaram um artigo em que realçavam a importância e grande utilidade da biópsia

hepática no diagnóstico da febre Q¹¹. Em 1990, Armindo Filipe e colaboradores estudaram a prevalência de anticorpos anti-*C. burnetii* numa população do sul de Portugal²⁷. Foram estudadas 487 amostras, com 2,2% de casos positivos. A prevalência observada neste estudo foi bastante inferior à obtida no ano anterior por Maria Regina Mendes, apesar da diferença óbvia nas populações estudadas.

A partir de 1 de Janeiro de 1999, a febre Q passou a ser uma doença de declaração obrigatória em Portugal, segundo normativa da Direcção Geral de Saúde (DGS), estando codificada como CID-10:A78.

2. Características Microbiológicas e Taxonomia

C. burnetii é um cocobacilo pleomórfico (tem a capacidade de assumir formas diferentes), Gram negativo e com dimensão aproximada de $0,3 \times 1,0 \mu\text{m}^{33}$.



Figura 1 – *Coxiella burnetii* em imagem de microscopia electrónica de varrimento numa ampliação de 2200x (fonte:Dennis Kunkel)

A coloração que melhor evidencia as características deste microrganismo é a de Giménez³⁴. Trata-se de uma bactéria intra-celular obrigatória, que se desenvolve nos fagolisossomas dos monócitos e macrófagos, células-alvo para onde entra passivamente. Já dentro das células, é internalizada em fagossomas, que se fundem rapidamente com lisossomas, formando fagolisossomas. Estes vão-se fundindo progressivamente para formar um grande vacúolo único.

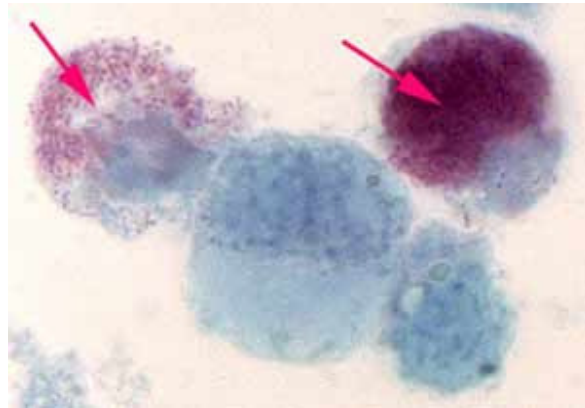


Figura 2 - *Coxiella burnetii* no interior de macrófagos de rato, coloração de Giménez. Ampliação de 100x
(Adaptado de Maurin,2003)

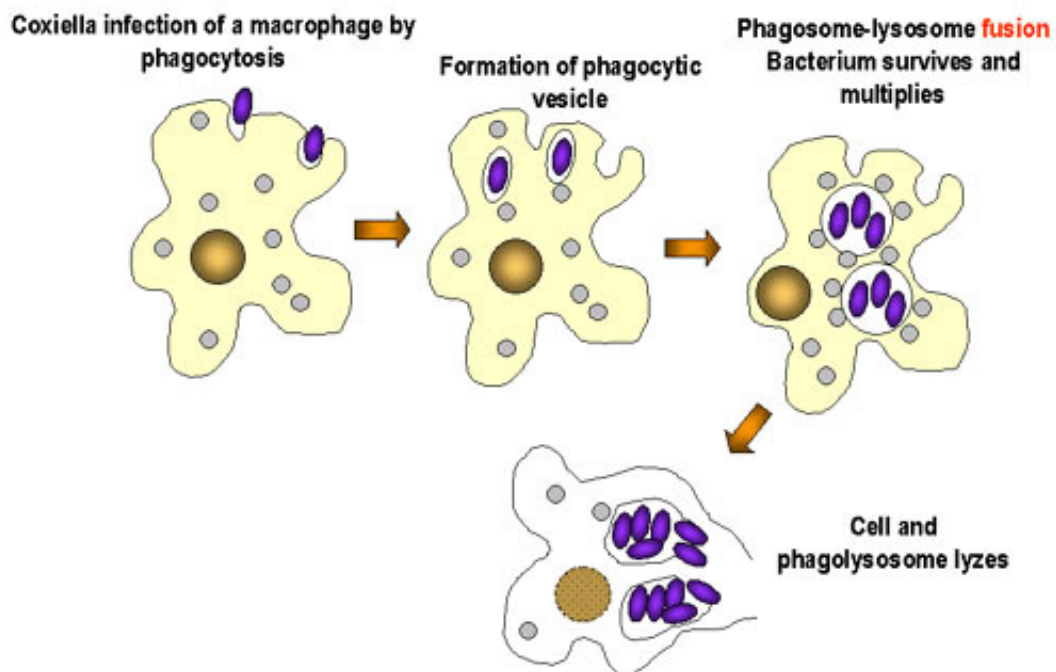


Figura 3 - Processo de entrada da bactéria nos macrófagos (Adaptado de Mayer,G. "Bacteriology – chapter Twenty-one: *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Coxiella* and *Bartonella*")

É uma bactéria acidófila, cujo metabolismo é óptimo a pH 4,7. Esta característica é extremamente invulgar, tendo apenas sido descrita numa forma amastigota de *Leishmania*².

C. burnetii apresenta uma característica que lhe permite resistir durante maiores períodos de tempo no ambiente: a formação de esporos (denominados *spore-like*, pois não são iguais aos esporos de bactérias de vida livre). Esta característica determina que a bactéria apresente uma extraordinária resistência a agentes físico-químicos, permitindo-lhe manter-se viável durante longos períodos de tempo, fora de qualquer organismo.

C. burnetii foi historicamente classificada como *rickettsia-like*, no género *Coxiella*, tribo Rickettsiaeeae, família Rickettsiaceae, Ordem Rickettsiales⁴⁵. Contudo em termos filogenéticos, a bactéria foi recentemente reclassificada, com base na análise de sequência de genes, nomeadamente do gene rRNA 16S e na análise do genoma (análise filogenética de um conjunto de 20 proteínas altamente conservadas e de proteínas comuns distribuídas pelo genoma). Este estudo de biologia molecular revelou elevada homologia com *Legionella pneumophila*, bactéria intracelular facultativa, classificada na subdivisão gama das Proteobactérias, tal como *Francisella tularensis* e *Rickettsiella grylli*, agente patogénico de artrópodes⁸⁹ e portanto distante do grupo das alfa-proteobactérias onde se encontram as “rickettsias”. A sua classificação sistemática actual, segundo a classificação de Carl Woese, estabelecida em 1990¹⁰¹, é super-reino

Bacteria; filo Proteobacteria; classe Gammaproteobacteria; ordem Legionellales; família Coxiellaceae; género *Coxiella*.

2.1 Variação Antigénica

Esta bactéria apresenta uma variação antigénica semelhante à encontrada noutras bactérias Gram negativas. Esta variação explica-se pela diferença da composição da parede celular, nomeadamente no que diz respeito aos lipopolissacáridos (LPS) que a constituem. As células em fase I encontram paralelo nas variantes antigénicas lisas de outras bactérias Gram negativas, são altamente infecciosas e podem ser encontradas em humanos, animais ou artrópodes infectados naturalmente. As células que se encontram em fase II, semelhantes às variantes rugosas de outras bactérias Gram negativas, são menos infecciosas e são obtidas em laboratório, após passagens seriadas em sistemas de cultura de células ou ovos embrionados. A composição em açúcares dos LPS é diferente nas duas fases³⁸⁻⁹. As células em fase I apresentam na sua constituição L-virenose, dihidrohidroxistreptose e galactosaminauronil- α -(1,6), açúcares estes que não estão presentes nas células em fase II. Não existe qualquer diferença entre células em fase I ou II a nível morfológico⁸⁷, baseando-se as diferenças na composição da parede celular e também na ausência de alguns determinantes proteicos na membrana. Pensa-se que a exposição ao baixo pH intrafagolisossomal e, talvez, aos sistemas enzimáticos e/ou nutrientes presentes nos vacúolos despoletem a diferenciação vegetativa das formas esporuladas (SCV: *small cell variant* - Fase II) em

formas metabolicamente mais activas (LCV: *large cell variant*- Fase I). A biogénese dos “esporos” parece estar em corpos densos polares observados nas LCV⁹⁸.

3. EPIDEMIOLOGIA

C. burnetii tem uma distribuição quase mundial e a febre Q é mais frequente em pessoas que tenham contacto profissional ou lúdico com ruminantes domésticos. A febre Q encontra-se limitada à espécie humana em termos de doença clínica, mas na Natureza existem várias espécies animais que são reservatórios do agente. Trata-se portanto de uma zoonose. A bactéria infecta naturalmente mais de 40 espécies de carraças, de 12 géneros diferentes. Este artrópode é o reservatório natural mais amplamente conhecido. O papel da carraça é essencial para a manutenção do agente na natureza, sendo o vector primário na transmissão da bactéria às espécies veterinárias. Vários autores já demonstraram que a bactéria está adaptada a sobreviver no interior da carraça, seja qual for o estado evolutivo desta. A disseminação do agente pelas carraças pode ser feita por picada da carraça em animais, aquando das suas refeições de sangue ou pelas fezes da carraça. Estima-se que cada grama de fezes de carraça possa conter até 10^{10} organismos viáveis¹, passando o solo a ser também um possível foco de infecção. A bactéria já foi identificada em cavalos, porcos, cães, gatos, camelos e búfalos. Outras espécies de mamíferos que também podem ser reservatório do agente são: esquilos, coelhos, ratazanas, ratos, babuínos, leopardos, hienas e morcegos. Este agente pode ainda ser encontrado em várias espécies de aves, selvagens ou domésticas, nomeadamente galinhas, pombos, patos, gansos e perus, que podem estar infectados⁴. Os animais infectados com *C. burnetii* normalmente não desenvolvem sintomas da doença. Apesar de já ter sido demonstrada a presença do agente em vários órgãos (sangue, pulmões, vesícula e fígado), durante a fase aguda da

doença, os animais permanecem assintomáticos, não desenvolvendo sequer qualquer tipo de febre. A infecção pode evoluir para a cronicidade, havendo uma contínua disseminação da bactéria. No entanto não existe o risco dos animais desenvolverem endocardite, como se verifica no Homem. As únicas manifestações patológicas associadas à infecção nos animais são abortos, principalmente em gado ovino e caprino^{70,99}, baixo peso à nascença e infertilidade, principalmente em gado bovino^{42,86}. À doença provocada pela bactéria nos animais dá-se o nome de Coxiellose.

Os animais com maior importância na transmissão do agente ao Homem são o gado bovino, ovino e caprino.

Qualquer dos grupos de animais referidos anteriormente pode transmitir a infecção ao Homem. No entanto é no contacto com o gado bovino, ovino e caprino que reside o maior risco de infecção. Estes animais, quando infectados, eliminam em grande quantidade a bactéria, nomeadamente nas excreções, na urina e no leite, que é uma fonte de infecção humana quando é consumido sem a pasteurização UHT (*ultra high temperature*), processo que consiste na fervura do leite à temperatura de 135° C durante 1 a 2 segundos. Esta metodologia foi instituída com o objectivo de eliminar os esporos de *C. burnetii*. Sabe-se também que é no momento do parto ou eventual aborto que é expelido o maior número de partículas infecciosas, nomeadamente no líquido amniótico, placenta e membranas fetais. Estima-se que cada grama de placenta dissemine cerca de 10^9 partículas infecciosas⁴.

A inalação de aerossóis contendo *C. burnetii* é a principal fonte de infecção humana. A bactéria é altamente infecciosa, podendo um único microrganismo ser responsável pelo

aparecimento de doença⁶¹. Estes aerossóis podem resultar do contacto directo com os animais e seus produtos, mas também indirectamente através da exposição ao ambiente por estes contaminado. Como referido anteriormente, os esporos de *C. burnetii* são muito resistentes aos agentes físico-químicos e facilmente dispersáveis por correntes, possibilitando a ocorrência de infecções espacial e temporalmente distantes da fonte de infecção. Não é assim de estranhar que existam relatos de surtos de febre Q associados à utilização de instalações outrora ocupadas por animais^{8,37} ou à disseminação do agente pelo vento que sopra das regiões de pastagem dos rebanhos, localizadas a quilómetros de distância⁹⁴, ou mesmo pela passagem dos rebanhos próximo de aldeias na mudança das pastagens de Verão para as de Inverno²³.

Como referido, *C. burnetii* apresenta uma característica que lhe permite resistir durante maiores períodos de tempo no ambiente: a formação de esporos. Esta característica permite que a bactéria apresente uma extraordinária resistência a agentes físico-químicos, permitindo-lhe manter-se viável durante largos períodos de tempo, fora de qualquer organismo vivo. Não é assim de estranhar que existam relatos de surtos de febre Q causados pela disseminação de partículas pelo vento⁹⁴ e pela movimentação pelas pastagens dos rebanhos de animais²³.

Outras formas possíveis de transmissão da infecção são a transmissão sexual⁶⁴, transmissão por picada de carraça⁹⁷, contacto directo com indivíduos infectados (possível através de aerossóis, mas raro)³³, a contaminação em exercício por parte de profissionais de saúde, nomeadamente durante a realização de partos⁸⁰, execução de autópsias⁵², a contaminação devido a ingestão de leite não pasteurizado²⁹ e transmissão através de transfusão sanguínea^{10,81}. Outra forma de transmissão da

doença também relatada, mas menos frequente é a transmissão transplacentária, que resulta em infecções congénitas^{80,91}.

A doença afecta sobretudo a população com idade compreendida entre os 30 e 60 anos, apesar de existirem casos descritos em crianças⁵⁰ e idosos⁵⁴, sendo mais frequente o seu aparecimento em homens⁵⁹. Sabe-se também que os indivíduos infectados por VIH têm uma probabilidade três vezes superior à população saudável de adquirir a infecção⁷⁹. Os grupos de risco para a febre Q são, como seria de esperar os pastores e agricultores, trabalhadores de matadouros, de indústrias transformadoras de carne, de leite e de outros produtos animais, veterinários e trabalhadores de laboratório que manuseiem o agente. Também se incluem neste grupo pessoas imunocomprometidas, especialmente se estiverem infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (VIH).

A febre Q já foi descrita em mais de 50 países diferentes⁵³. Até há poucos anos considerava-se que esta infecção humana estava disseminada por todo o mundo, à excepção da Nova Zelândia. Com efeito, um inquérito seroepidemiológico aí realizado por Frans Hilbink, em cães e bovinos, cujos resultados foram divulgados em 1993 apresentava resultados negativos para toda a população animal testada, cerca de 15.700 animais⁴¹. No entanto, em 2003, surgiram relatos de três casos positivos para febre Q num total de 97 amostras testadas no âmbito de um programa de serovigilância humana relacionado com a importação ilegal de coelhos a partir da Austrália³⁶. Mas permanecem dúvidas sobre se estes casos terão sido contaminações ocorridas em solo neo-zelandês ou infecções importadas de outros países, nomeadamente da Austrália, país onde a prevalência da infecção é elevada.

4. *Coxiella burnetii* e o Bioterrorismo

Actualmente existe um grande receio por parte da população mundial em vir a sofrer um ataque terrorista com utilização de armas biológicas, o chamado bioterrorismo (BT). Os ataques ocorridos em Nova Iorque a 11 de Setembro de 2001 foram um marco histórico. Durante algum tempo foram descritos inúmeros casos de potenciais ataques biológicos, nomeadamente com recurso à utilização de partículas de *Bacillus anthracis*, disseminadas através de envelopes enviados pelo serviço normal de correio. Um ataque com armas biológicas não é mais do que a disseminação de partículas de um microrganismo de elevada infecciosidade e com características facilitadoras para a sua propagação.

Existem várias razões para se considerar *C. burnetii* como uma potencial arma para BT. A mais importante é o facto de a principal via de infecção humana ser pela inalação de aerossóis. Está estimado que se fossem lançados 50 quilogramas de partículas de *C. burnetii* sobre uma área onde vivesse uma população de 500.000 pessoas, teríamos 125.000 infecções agudas, 9000 infecções crónicas e 150 mortes⁶⁸.

Existe ainda outro aspecto importante que tem a ver com a dose de inóculo necessária para provocar doença. Sawyer e colaboradores concluíram no seu estudo que um a dez organismos eram suficientes para provocar infecção⁸⁵. Mais recentemente, McQuiston e colaboradores referem ser suficiente apenas um organismo para provocar doença no Homem⁶¹. A capacidade que estas bactérias apresentam para formar esporos e assim se disseminarem, torna-as altamente resistentes ao meio-ambiente, tendo capacidade para suportar condições quase extremas, suportando por exemplo nomeadamente

radiações ultravioletas, variações de pH, hipoclorito de sódio numa concentração de 100 mg/L, entre outras^{4,49,88}.

No entanto, a utilização de *C. burnetii* como agente num eventual ataque bioterrorista é questionável. O período de incubação é longo, provoca uma grande percentagem de infecções assintomáticas e a taxa de mortalidade associada é relativamente baixa, apesar de ter uma elevada taxa de morbilidade. A sua utilização faria mais sentido num ataque cujo objectivo fosse incapacitar parte da população em vez de a aniquilar. Estas características levaram o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, EUA) a classificar *C. burnetii* na categoria B da lista de agentes passíveis de serem usados como armas biológicas^{13,15}.

Em suma e perante o exposto podemos afirmar que apesar de possuir algumas características que potencialmente a tornam uma boa ferramenta para utilização em BT, *C. burnetii* não constitui à partida ameaça biológica para as populações.

5. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA INFECÇÃO

A febre Q apresenta uma grande variedade de sintomas e de grande inespecificidade. Em cerca de 50% dos casos pode inclusivé desenvolver-se uma infecção assintomática. Nos restantes casos, os sintomas podem variar, desde doença febril auto-limitada até à doença crónica, dependendo de múltiplos factores. Na doença crónica os imunocomplexos têm um papel na patogenia⁶⁰.

Excelentes resumos sobre este tema podem ser encontradas em várias obras e artigos de revisão^{7,55,57,59,81-2}.

5.1 FEBRE Q AGUDA

O período de incubação da infecção pode normalmente variar entre duas a três semanas, dependendo da quantidade de inóculo e da via de infecção⁴⁷. Não é, ainda, claro se a estirpe da bactéria e os factores do hospedeiro podem, ou não, ter influência na duração do período de incubação.

Existe uma grande variedade de sintomas e sinais associados à infecção aguda, no entanto alguns são relatados em quase todos os casos descritos, nomeadamente a febre, astenia, arrepios, cefaleias e mialgias, como se pode constatar analisando a Tabela 1.

Tabela 1 - Sintomas e sinais observados em doentes com febre Q aguda
(Adaptado de Maurin *et Raoult*, 1999)

Sintomas e sinais manifestados	Percentagem de doentes
Febre	88 - 100
Astenia	97 - 100
Arrepios	68 - 88
Cefaleias	68 - 98
Mialgias	47 - 69
Sudorese	31 - 98
Tosse	24 - 90
Náuseas	22 - 49
Vómitos	13 - 42
Toracalgia	10 - 45
Diarreia	5 - 22
Urticária	5 - 21

A fraca especificidade dos sinais e sintomas da doença é uma das explicações possíveis para a febre Q aguda poder passar despercebida, regredindo espontaneamente. Nestes casos a única forma de demonstrar que houve infecção é através de serologia. O quadro clínico pode-se caracterizar-se por uma síndrome febril não localizada, podendo acompanhar-se de pneumonia ou de hepatite. Existem, no entanto, outros achados biológicos que podem decorrer da infecção (Tabela 2).

**Tabela 2 - Achados laboratoriais em doentes com febre Q aguda (sintomática ou assintomática)
(Adaptado de Maurin *et Raoult*, 1999)**

Achados Laboratoriais	Percentagem de doentes
Contagem de leucócitos normal	90
Trombocitopénia	25
Aumento de transaminases (AST/ALT)	45 - 85
Aumento de bilirrubina	9 – 14,3
Aumento de fosfatase alcalina (ALP)	27,7 – 57
Aumento de Gama-glutamil transpeptidase (Gama GT)	25 – 75
Aumento de creatininafosfoquinase (CPK)	29
Aumento de lactatodesidrogenase (LDH)	33,3 – 40
Aumento de creatinina	29 – 40
Aumento de Velocidade de Sedimentação Eritrocitária (VS)	43 – 87,5
Presença de anticorpos anti-músculo liso	65
Presença de anticorpos anti-fosfolípidos	50

A pneumonia por febre Q aguda é geralmente acompanhada de febre e cefaleias intensas, apesar de uma grande variedade de outros sintomas poderem estar presentes. A auscultação do doente normalmente permite detectar crepitações inspiratórias, sendo que o exame radiológico do pulmão é de grande interesse. São normalmente visíveis opacidades simples ou múltiplas de configuração redonda, efusão pleural, atelectasia, opacidades bilaterais ao nível dos lóbulos inferiores, entre outras⁵⁷. Outros sinais e sintomas frequentemente encontrados na pneumonia provocada por febre Q são anorexia, tosse seca ou produtiva, arrepios, dor pleurítica, mialgias e artralgias.

No entanto, nem o quadro clínico nem o exame radiológico permitem distinguir esta pneumonia das provocadas por outros agentes etiológicos, tais como *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia psittaci* ou *C. pneumoniae*.

A outra manifestação importante na infecção aguda é a hepatite, havendo normalmente elevação das transaminases, da fosfatase alcalina e da gama-GT. Os valores destas enzimas poderão estar aumentados até três vezes em relação ao valor normal. Este quadro é normalmente acompanhado por febre e por vezes também por dor abdominal (especialmente no hipocôndrio direito), anorexia, vômitos, diarreia e náuseas⁵⁹. Podem ser observáveis lesões histológicas no fígado, nomeadamente granulomas, de forma circular, constituídos por um anel fibrinóide e espaço central lipídico (em forma de *donut*). Assim sendo, a realização de biopsia hepática nestes casos poderá simplificar o diagnóstico^{11,51,62}, apesar dos granulomas hepáticos apenas se apresentarem em 3 a 10% das biopsias realizadas. Apesar destes granulomas serem bastante sugestivos de febre Q, também podem ser encontrados em doentes com doença de Hodgkin, mononucleose infecciosa e leishmaniose.

De referir que febre, pneumonia e hepatite podem co-existir. Num estudo realizado por Tissot-Dupont e colaboradores (1992) em 323 doentes franceses hospitalizados com febre Q aguda, observou-se que 25% apresentavam as três manifestações em simultâneo, enquanto 40% apresentavam febre e transaminases aumentadas, 17% apresentavam febre e sinais de envolvimento pulmonar e apenas 8%, 6% e 4% apresentavam respectivamente casos isolados de febre, sinais de envolvimento pulmonar ou aumento das transaminases⁹².

Os quadros de envolvimento neurológico podem acontecer, mas são bastante raros. Estes podem incluir meningoencefalite, meningite, meningite asséptica, mielite, nevrite óptica ou neuropatia periférica⁵⁹.

A febre Q aguda é uma doença que, em regra, regride espontaneamente em cerca de duas a três semanas. Apenas cerca de 5% dos doentes sintomáticos desenvolvem complicações. Casos fatais são extremamente raros⁵⁹.

5.2 FEBRE Q CRÓNICA

A doença crónica normalmente instala-se no período de seis meses a um ano. No entanto a doença pode manifestar-se até cerca de 20 anos após a infecção inicial⁷. Estão especialmente associados a esta condição indivíduos com valvulopatias, próteses valvulares e articulares, grávidas e pessoas com imunodepressão (transplantados, hemodialisados, com neoplasias e doentes com SIDA).

A manifestação mais frequente de febre Q crónica é a endocardite⁵⁹. É possível encontrar esta complicação em 60 a 70% dos casos crónicos. A endocardite por febre Q representa 3% de todos os casos diagnosticados em Inglaterra e no País de Gales⁶⁹, e cerca de 5% do total em França³². É potencialmente mortal se não for tratada, mas apresenta apenas uma taxa de mortalidade de cerca de 10% nos casos em que é feito o tratamento com antibioticoterapia adequada. Outras formas de febre Q crónica têm vinda a ser identificadas, embora com menor expressão e gravidade que a endocardite tais como osteomielite, osteoartrite, hepatite crónica isolada, fibrose pulmonar e endometrite com aborto⁵⁹.

Os casos de endocardite por febre Q estão normalmente quase todos associados (cerca de 90%) a deficiências nas válvulas cardíacas dos doentes afectados. As válvulas mais afectadas são a mitral e a aórtica. Recentemente têm-se assistido ao aparecimento de febre Q crónica em doentes com próteses valvulares⁵⁹. Indivíduos do sexo masculino, normalmente com mais de 40 anos representam 75% das infecções.

Apesar da endocardite ser o principal sintoma da doença crónica, outros poderão ser detectados, tais como: mal-estar geral, fraqueza, fadiga, perda de peso, arrepios, febre, anorexia, suores nocturnos, por exemplo⁵⁹. Pode também ser observável envolvimento de outros órgãos, nomeadamente hepatomegália e esplenomegália, púrpura, embolismo arterial, anemia e aumento da velocidade de sedimentação. A endocardite por febre Q normalmente apresenta-se com hemoculturas negativas. Cerca de 90% dos doentes apresentam imunoglobulinas aumentadas, bem como factor reumatóide e crioaglutininas positivas.

O período de tratamento da infecção crónica é bastante longo, sendo pelo menos de 18 meses de antibioticoterapia. Por vezes é necessário que os doentes sejam submetidos a válvuloplastia cardíaca. Alguns autores defendem a continuação de um tratamento com antibióticos durante um período alargado após a implantação da prótese, havendo risco de reinfeção⁷¹.

Estes doentes devem ser cuidadosamente acompanhados ao longo do tempo, nomeadamente em termos serológicos, de forma a garantir que a infecção foi controlada.

6. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Devido à reduzida especificidade dos sinais e sintomas da febre Q os métodos de diagnóstico laboratorial são uma ferramenta de extrema utilidade para confirmar ou refutar a suspeita clínica.

Podemos dividir estas metodologias em dois tipos:

- **Métodos directos:** pesquisam directamente a presença da bactéria na amostra biológica
- **Métodos indirectos:** pesquisam a presença de anticorpos contra a bactéria produzidos pela resposta imunitária

6.1 Métodos de diagnóstico directo

A utilização destes métodos é pertinente quando se visa detectar directamente a presença do agente, neste caso uma bactéria, na amostra biológica. É portanto importante referir que a sua utilização pressupõem destes métodos é oportuna nos casos em que o doente ainda não tenha sido submetido a qualquer tratamento com antibióticos, pois a administração destes limita a utilidade desta abordagem.

Para a detecção directa de *C. burnetii*, podemos utilizar três tipos de técnicas:

- Visualização por técnicas de imunohistoquímica;
- Detecção de ADN por técnica de biologia molecular;
- Isolamento por cultura;

Visualização por técnicas de imunohistoquímica

Nesta abordagem conseguimos visualizar a presença da bactéria nos tecidos afectados, utilizando técnicas de imunohistoquímica. Esta abordagem é adequada quando temos a possibilidade de estudar tecidos, nomeadamente fragmentos valvulares ou tecido cardíaco afectado. Maurin *et Raoult* consideram que estas técnicas devem apenas ser utilizadas nestes casos, não sendo de grande utilidade para outros tipos de amostra, em virtude do reduzido número de microrganismos presentes, que habitualmente caracteriza a infecção⁵⁹.

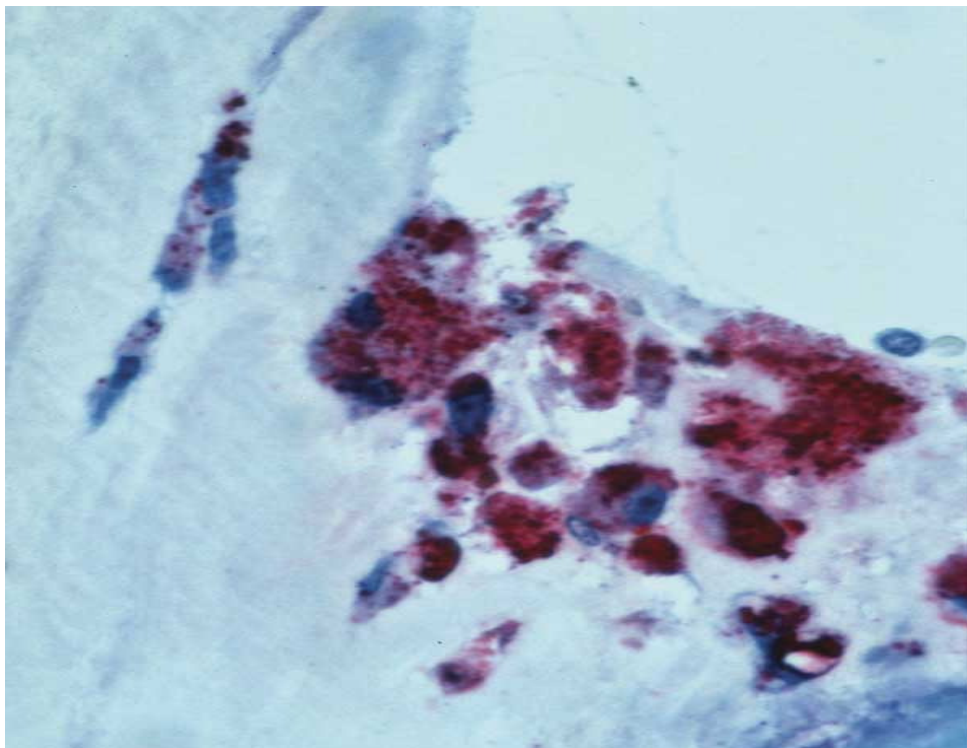


Figura 4 - Localização imunohistoquímica de *Coxiella burnetii* numa válvula aórtica de um doente co-infectado com VIH. Ampliação de 100x (Adaptado de Madariaga *et al.*, 2004)

Detecção de ADN por técnicas de biologia molecular

A detecção de ADN de *C. burnetii* é outra possibilidade de diagnóstico. Habitualmente recorre-se à reacção de polimerase em cadeia simples (PCR) ou duplicada (nested-PCR). Estão descritos actualmente vários tipos de oligonucleótidos (primers) específicos para determinados segmentos de alguns genes da bactéria, nomeadamente os genes 16S *rDNA*, *sodB*, *gltA* e *htpAB*³³. Esta técnica é bastante sensível e apresenta grande especificidade, permitindo a utilização em praticamente todo o tipo de amostras biológicas. No entanto a técnica não é apropriada para utilização em amostras de sangue, devido ao facto de neste tipo de produto ser frequente a obtenção de resultados falso-positivos⁵⁹. Recentemente em 2006, foi otimizada uma técnica que utiliza a nova metodologia de PCR em Tempo Real (Real Time PCR) para detecção do gene *icd* (Nguyen e colaboradores demonstraram estar presente em 19 isolados humanos de origens geográficas distintas⁶⁶) e do gene do elemento de inserção *IS 1111*, que está presente em múltiplas cópias no genoma da estirpe de *C. burnetii* Nine Mile RSA493⁸⁹.

O PCR Real Time representa actualmente o *gold standard* na detecção directa de *C. burnetii*⁴⁴. É uma técnica com maior sensibilidade, permitindo a visualização em tempo real da quantificação de ADN bacteriano encontrado na amostra. É uma metodologia bastante dispendiosa na sua implementação, por necessitar de equipamentos e reagentes ainda de alto custo para utilização em rotina de diagnóstico.

Isolamento por cultura

O isolamento por cultura de *C. burnetii* é uma técnica que requer condições de segurança consideráveis para que o agente possa ser manuseado sem risco para o operador. O CDC classificou esta bactéria como pertencente ao nível 3 em termos exigência de segurança biológica, numa escala de 1 a 4 em que o nível 4 representa o expoente máximo do perigo biológico⁶. Acontece que poucos laboratórios reúnem essas condições e como tal não têm autorização para recorrer a essa metodologia.

Como a bactéria é intracelular estrita, não podem ser utilizados os meios de cultura usuais em laboratório de microbiologia, sendo utilizadas linhas celulares para o isolamento e propagação do agente.

A cultura do agente pode ser efectuada recorrendo a vários tipos de células de crescimento contínuo *in vitro*. Habitualmente são utilizadas linhas do tipo macrofágico (P388D1 e J774), fibroblástico (L929) e epitelial (Vero)³.

A técnica que é utilizada chama-se Shell-vial e foi adaptada dos estudos realizados para vírus e outras bactérias intracelulares obrigatórias³⁵. Consiste na centrifugação das amostras biológicas sobre uma monocamada de células, seguida de um período de incubação longo, neste caso entre cinco a sete dias a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. Após esta incubação, é testada a presença de *C. burnetii* na cultura, utilizando um soro policlonal anti – *C. burnetii*, através de uma reacção de imunofluorescência indirecta ou utilizando a coloração de Giménez. Os ensaios de isolamento do agente adequam-se a vários tipos de amostra, nomeadamente sangue total, líquido céfalo-

raquidiano, medula óssea, válvulas cardíacas, aneurismas vasculares, biopsias ósseas, biopsias hepáticas, leite, placenta e fetos abortados⁵⁹.

Apesar de ser uma técnica muito específica, não é muito sensível, sendo sempre normalmente realizada em paralelo com a detecção molecular do agente por PCR. *C. burnetii* é de crescimento lento, podendo demorar mais de duas semanas até haver conclusões sobre o resultado de uma cultura. Como tal, esta técnica poderá não ser muito útil aos clínicos e aos doentes, em virtude de tão prolongado período de crescimento, acabando por funcionar como ferramenta de confirmação laboratorial e de investigação, mas sem utilidade imediata para o diagnóstico clínico.

6.2 Métodos de diagnóstico indirecto

A pertinência da utilização destes métodos coloca-se quando a infecção já se encontra no seu decurso há alguns dias e o tratamento antibiótico já foi instituído. A resposta imunitária pode levar desde poucos dias a várias semanas a desenvolver-se, dependendo por exemplo do estado imunológico do doente infectado.

Existem vários métodos descritos para detectar a presença de anticorpos em circulação, mas há três que são considerados os mais fiáveis e por isso são os mais frequentemente utilizados:

- Imunofluorescência Indirecta (IFI)
- Fixação do Complemento (CF)
- *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Imunofluorescência Indirecta

É actualmente o método de referência para o serodiagnóstico da febre Q, segundo a OMS⁶⁷. É de extrema simplicidade e bastante precisa nos seus resultados. Existe actualmente comercializada por várias casas comerciais, disponibilizando os reagentes já preparados ou em alternativa o laboratório com nível de biosegurança 3 poderá cultivar o antigénio para produzir as suas próprias lâminas. É de realçar que devido aos elevados requisitos em termos de segurança laboratorial, existem poucos laboratórios a nível europeu com esta capacidade, optando a maior parte por adquirir os *kits* comerciais disponíveis no mercado.

Com esta técnica podemos detectar anticorpos do tipo IgG, IgA e IgM, para antigénio de fase I e II, que indiciam doença crónica ou aguda, respectivamente. Uma interferência frequente nesta metodologia é a presença na amostra de factor reumatóide, que provoca falsos positivos. Para impedir esta interferência, deve ser utilizado um absorvente de factor reumatóide, que remove os anticorpos do tipo IgG antes da determinação dos anticorpos do tipo IgA e IgM.

Deve ser estabelecido o limiar de positividade ou *cut-off*, que é o valor a partir do qual uma amostra é considerada positiva. Estes valores não são universais e devem ser ajustados em cada país ou região, tendo sempre em conta a reactividade natural da população para o agente.

Esta técnica é difícil de automatizar já que a observação microscópica das lâminas requer experiência e os resultados podem por vezes ser subjectivos devido a esse motivo.

Fixação do Complemento

Esta técnica é bastante específica, apesar de ser menos específica que a IFI. Falta-lhe no entanto a sensibilidade. Permite detectar anticorpos anti-fase I e anti-fase II, apesar dos soros necessitarem de ser inactivação pelo calor antes de serem testados para detecção de anticorpos anti-fase II⁴⁰. A interpretação de resultados neste método necessita de amostras recolhidas em fase aguda e na fase convalescente para poder emitir o resultado final, o que nem sempre é possível de conseguir na prática diária. É um método mais demorado do que a IFI. A sua aplicação actualmente é reduzida.

Enzyme Linked Immunosorbent assay (ELISA)

A utilização da técnica de ELISA surge como alternativa à IFI e CF. Foi inicialmente descrita por Peter Field²⁶ e seus colaboradores em 1983, apresentando-se como técnica mais sensível e específica que a CF. Permite detectar anticorpos do tipo G, A e M produzidos contra o antigénio de fase I ou II. É uma técnica que é facilmente automatizável, o que só traz vantagens ao operador, visto ser bastante laboriosa quando efectuada manualmente. Como tal é indicada para processar um grande número de amostras, nomeadamente quando se tratam de inquéritos seroepidemiológicos. Uma desvantagem desta técnica é o facto de requerer bastante experiência na interpretação dos resultados. A sua aplicação é por isso, ainda limitada, mas existem grandes desenvolvimentos nesta metodologia.

Comparação entre CF, IFI e ELISA

Estudos realizados por Péter e colaboradores em 1987, demonstraram que num lote de 213 soros de doentes suíços, a ELISA e a IFI demonstraram níveis de sensibilidade semelhantes (94,8% *versus* 90,6%), mas superiores quando comparados com a CF (77,8%)⁷².

Em todas as técnicas o nível de especificidade é bastante elevado. Em 1992 Finidori e colaboradores produziram um estudo onde demonstraram que não existia reacção cruzada entre *C. burnetii* e *Legionella pneumophila*, bactérias filogeneticamente próximas²⁸. Existem descritas reacções cruzadas com *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae* e *Legionella micdadei* em imunofluorescência^{46,65}. No entanto a IFI hoje em dia apresenta níveis de especificidade próximos de 100%.

Sendo assim e com base nestas considerações constata-se que a IFI será a técnica de referência para a detecção de anticorpos sempre que o número de soros a testar seja reduzido, enquanto que a ELISA constitui uma opção mais interessante sempre que o número de amostras a testar é elevado (por exemplo, nos inquéritos seroepidemiológicos).

7. TRATAMENTO

A abordagem para o tratamento difere consoante se esteja em presença de uma infecção aguda ou crónica.

7.1 Tratamento da infecção aguda

As infecções agudas na sua maioria são assintomáticas ou regridem espontaneamente em cerca de duas semanas. Se considerarmos também que os métodos de diagnóstico consomem tempo valioso até disponibilizarem um resultado, principalmente na detecção de anticorpos, devido ao tempo que leva a desenvolver-se a resposta imunológica (cerca de duas a três semanas), podemos ter dificuldades em aquilatar da eficiência de um determinado regime antibiótico. É difícil obter dados concretos sobre a eficiência da terapêutica antibiótica e são escassos os estudos que comparam a utilização de diferentes fármacos.

Um estudo realizado em doentes com pneumonia por febre Q comparou a utilização de tetraciclina face ao uso de um placebo⁷⁵. A administração de tetraciclina em quatro tomas diárias de 500 mg reduziu a duração da febre em 50%. No entanto a terapêutica tinha de ser iniciada durante os três primeiros dias de doença para ser eficaz.

Sendo assim é recomendável que nos casos em que os doentes apresentam sintomas severos seja prontamente iniciada uma terapêutica empírica.

Um estudo em doentes com febre Q aguda demonstrou que a duração da febre em indivíduos não tratados foi de 3,3 dias, enquanto que indivíduos tratados com

tetraciclina (500 mg/quatro vezes ao dia) tiveram febre durante 2 dias e indivíduos tratados com doxiciclina (100 mg/duas vezes ao dia) tiveram febre durante 1,7 dias⁹⁰.

Actualmente a doxiciclina é preferida à tetraciclina pois possui propriedades farmacocinéticas melhoradas e provoca menos frequentemente intolerância gástrica.

A doxiciclina é por isso o antibiótico de uso comum para o tratamento da infecção aguda, num regime de 100 mg/duas vezes ao dia em adultos ou 3 mg/kg/dia em pediatria durante uma duração mínima de 14 dias. No caso de doentes com intolerância gástrica, a sua utilização deve ser limitada. O seu uso é contra-indicado em crianças com menos de 8 anos de idade e em grávidas. Para estes grupos, pensa-se que uma terapêutica com macrólidos ou cotrimoxazole possa vir a constituir uma alternativa eficaz, apesar de ainda não estar confirmada essa possibilidade⁵⁹.

7.2 Tratamento da infecção crónica

A endocardite por febre Q é a apresentação clínica mais frequente da infecção crónica e também aquela que apresenta o maior grau de severidade. Apesar de a sua evolução ser lenta e poder demorar vários anos os doentes com esta patologia sem antibioticoterapia adequada vão eventualmente morrer devido à mesma⁵⁹.

Existem várias condicionantes que dificultam a utilização de antibióticos para combater a infecção crónica. Estudos *in vitro* demonstraram que *C. burnetii* é resistente à acção de β -lactâmicos e de aminoglicosídeos^{77,102} e por isso estes antibióticos individualmente ou em associação não são eficazes no combate à infecção. O uso de tetraciclina isoladamente revela eficácia^{25,95,100}, mas exige regimes prolongados, uma vez que as

recaídas são frequentes. Devido à intolerância gástrica provocada pelo uso de tetraciclina, outras monoterapias alternativas foram testadas, nomeadamente cotrimoxazole, rifampicina e fluoroquinolonas. Apesar de existirem melhorias no estágio inicial, a maior parte dos doentes tiveram recaídas após o final da terapêutica. Sendo assim, foram propostos regimes terapêuticos alternativos, baseados na combinação de fármacos.

Após o estudo de várias associações de fármacos chegou-se à conclusão que a associação de doxiciclina com um agente alcalinizante, como a cloroquina permite obter resultados mais eficazes na actividade bactericida contra *C. burnetii*. Assim a manutenção deste regime terapêutico durante um período mínimo de 18 meses permite evitar um grande número de recaídas⁵⁸. A duração óptima do tratamento não está definida devido ao facto de não existir um critério definido para a cura. Raoult e colaboradores defendem que devem ser titulados os anticorpos anti-IgG em fase I. Se o título for ≤ 200 , devemos considerar que o doente atingiu uma fase de cura⁷⁶.

Sendo assim é recomendada a terapia associada de doxiciclina (100 mg /duas vezes ao dia) com cloroquina (200 mg/ três vezes ao dia) durante pelo menos 18 meses. Nos doentes em que por qualquer motivo não seja possível utilizar a terapêutica anterior existe um esquema alternativo que consiste em associar doxiciclina (100 mg/duas vezes ao dia) com ofloxacina (200 mg/três vezes ao dia).

Após o final do tratamento, os doentes devem continuar a ser monitorizados, com avaliações clínicas e biológicas periódicas. Em termos laboratoriais, devem ser monitorizados os níveis das enzimas hepáticas e de creatinina no soro e também a

serologia para a febre Q. A periodicidade desta monitorização deverá ser mensal durante os primeiros seis meses após o final da terapêutica e depois a cada seis meses até completar dois anos.

A cloroquina pode ter efeito nocivo nos doentes, nomeadamente provocar retinopatia. É por isso aconselhável a realização regular de exames oftalmológicos. A monitorização do nível de cloroquina no soro do doente também deve ser efectuada e esta deverá manter-se em $1 \pm 0,2$ mg/litro, sendo frequente que a dose de cloroquina administrada tenha de ser ajustada em virtude de provocar intolerância nos doentes⁵⁹.

O funcionamento cardíaco também deverá ser monitorizado, nomeadamente com a realização de um ecocardiograma a cada três meses após o fim do tratamento. Após seis meses e se o doente continuar sem sintomas, a periodicidade passará a ser semestral até aos dois anos.

A substituição de válvulas cardíacas é uma hipótese de tratamento a considerar, sendo que normalmente acontece apenas quando há falha hemodinâmica do coração. A acontecer deverá sempre ser cumprido o tratamento com antibióticos, de forma a prevenir eventual contaminação da prótese valvular, com *C. burnetii* que esteja alojada noutros locais, nomeadamente noutras válvulas cardíacas, correndo assim o risco de reinfeção. Sendo assim, este é claramente um risco potencial, sendo por isso de realçar a importância da monitorização destes doentes durante os períodos recomendados⁷⁸.

8. PREVENÇÃO

Por se tratar de uma zoonose, as medidas que devem ser implementadas para a prevenção da infecção são da responsabilidade conjunta de clínicos, epidemiologistas e veterinários. Só contando com estreita colaboração entre estes profissionais se podem tomar medidas que permitam controlar os casos de infecção.

Podem dividir-se as medidas de prevenção em dois grupos. O primeiro grupo inclui todas as medidas direccionadas ao controlo da infecção nos animais, visando diminuir a transmissão ao Homem. No segundo grupo estão contidas medidas que visam directamente as pessoas.

Sabemos que o espectro de reservatórios animais é extenso e é impossível tomar medidas que sejam eficazes para todas as espécies que já foram descritas como reservatório de *C. burnetii*. Por isso as medidas gerais acabam sempre por incidir sobre as várias espécies de gado, que como se sabe são a principal fonte de infecção para o Homem.

O CDC sugere algumas medidas que podem ser instituídas¹⁴:

- Incineração de placentas, produtos fetais, membranas e fetos abortados nas explorações de gado;
- Limitar o acesso aos estábulos e laboratórios onde existam animais potencialmente infectados;
- Isolamento dos animais gestantes, sobretudo no parto e no pós-parto;
- Limpeza e desinfectação frequente dos estábulos;

- Pesquisar regularmente se os animais possuem carraças e retirá-las se existirem, para evitar que estas transmitam a bactéria a outros animais que ainda não estejam infectados;
- Colocar animais importados num período de quarentena, antes de os juntar ao restante efectivo;
- Tentar que as explorações animais sejam afastadas de zonas habitadas pela população;
- Os animais devem ser regularmente testados, fazendo a pesquisa de anticorpos anti – *C. burnetii*;
- Deve evitar-se a livre circulação de ar da exploração animal para o exterior, para impedir a disseminação das partículas de *C. burnetii*;
- Planos concertados para desinfestação do efectivo animal;

Existem também algumas medidas que são direccionadas à população:

- Consumir apenas produtos lácteos pasteurizados;
- Educar a população para as fontes possíveis de infecção;
- Utilizar procedimentos correctos para tratar a roupa utilizada por trabalhadores de laboratórios e de explorações animais onde exista gado infectado;
- A manipulação do agente em laboratório deve apenas ser realizada em nível três de bio-segurança;
- A vacinação deve ser aconselhada a grupos de risco, nomeadamente: trabalhadores de explorações animais, veterinários, trabalhadores de laboratório, trabalhadores de

matadouros ou indústria de processamento de carnes, trabalhadores têxteis (que processem lã, por exemplo);

- Aconselhamento específico para pessoas em alto risco de desenvolver febre Q crónica (doenças cardíacas valvulares ou com próteses valvulares, grávidas e doentes imunossuprimidos);

Algumas considerações sobre a vacinação

Após vários estudos em animais e humanos foi aprovada em Março de 1989 na Austrália, uma vacina para uso humano. É comercializada com o nome de “Q-VAX”, pela empresa australiana “CSL Limited”. Trata-se de uma suspensão purificada de *C. burnetii* (estirpe Henzerling em fase I) inactivada com formalina, preparada em cultura de célula embrionária de ovo. Estudos realizados entre 1985 e 1990 em trabalhadores de matadouros voluntários, demonstraram que num grupo de 2555 trabalhadores vacinados ocorreram apenas dois casos de febre Q enquanto num grupo de 1365 trabalhadores que não receberam a vacina, aconteceram 55 casos de febre Q. A vacina ofereceu protecção durante os cinco anos que este estudo durou⁵⁹.

A febre Q é sobretudo uma doença que surge devido a exposição profissional. Isso reflecte-se nos principais grupos de risco para a infecção. Como tal, estes são os grupos recomendados para a administração da vacina. Além disso, deverão também ser incluídos neste lote as pessoas que apesar de não terem uma exposição constante ao agente, estão em risco de contrair febre Q crónica, nomeadamente indivíduos com doenças cardíacas valvulares ou próteses, aneurismas vasculares e imunossuprimidos.

No entanto existem algumas contra-indicações para o uso da vacina:

- Não deve ser usada em pessoas que já tenham tido febre Q;
- Não deve ser usada em pessoas que já tenham sido vacinadas contra a febre Q anteriormente;
- Antes da administração deve ser feito um teste dérmico e serologia para a febre Q. Se algum destes testes for positivo, a vacina não deve ser administrada;
- Não há descrição dos efeitos da vacina em lactentes, crianças e grávidas;

Reacções adversas à administração da vacina podem incluir:

- Reacção dérmica no local da inoculação (exantema, induração ou edema, nos casos mais raros pode haver formação de abscessos locais);
- Reacções sistémicas como cefaleias, febre, mialgias, etc.

9. A FEBRE Q EM PORTUGAL

Os primeiros casos de febre Q em Portugal foram relatados por Fernando da Fonseca em 1947. Desde essa altura pouco mais se tem descrito sobre a doença. Sabe-se que não foram identificados quaisquer surtos no país, mas a informação disponível é vaga. Em 1 de Janeiro de 1999, a febre Q passou a ser uma doença de declaração obrigatória (DDO) em Portugal (CID-10:A78). A partir dessa data passou a estar disponível mais informação sobre os casos notificados em Portugal, nomeadamente sobre a sua origem geográfica e sazonal. A consulta dos relatórios periódicos emitidos pela Direcção Geral de Saúde (DGS)²⁰⁻² permite-nos obter mais informações. As figuras 5 e 6 dão-nos mais alguma informação em relação aos dados disponíveis em Portugal.

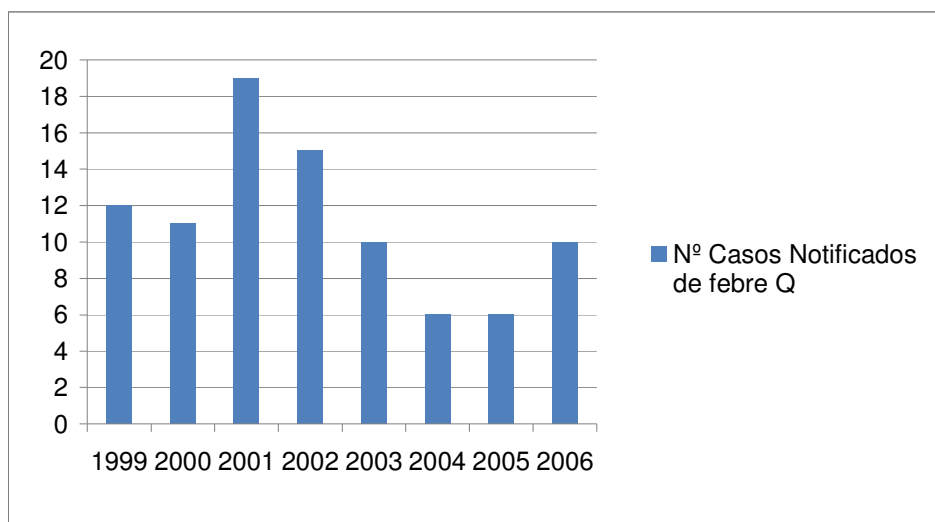


Figura 5 - Número de casos de febre Q notificados em Portugal entre 1999 e 2006 (fonte:DGS)

O número de casos notificados em Portugal não é muito elevado e tem-se vindo a assistir a uma ligeira tendência para a diminuição das notificações. A taxa de incidência da infecção no país é consideravelmente baixa.

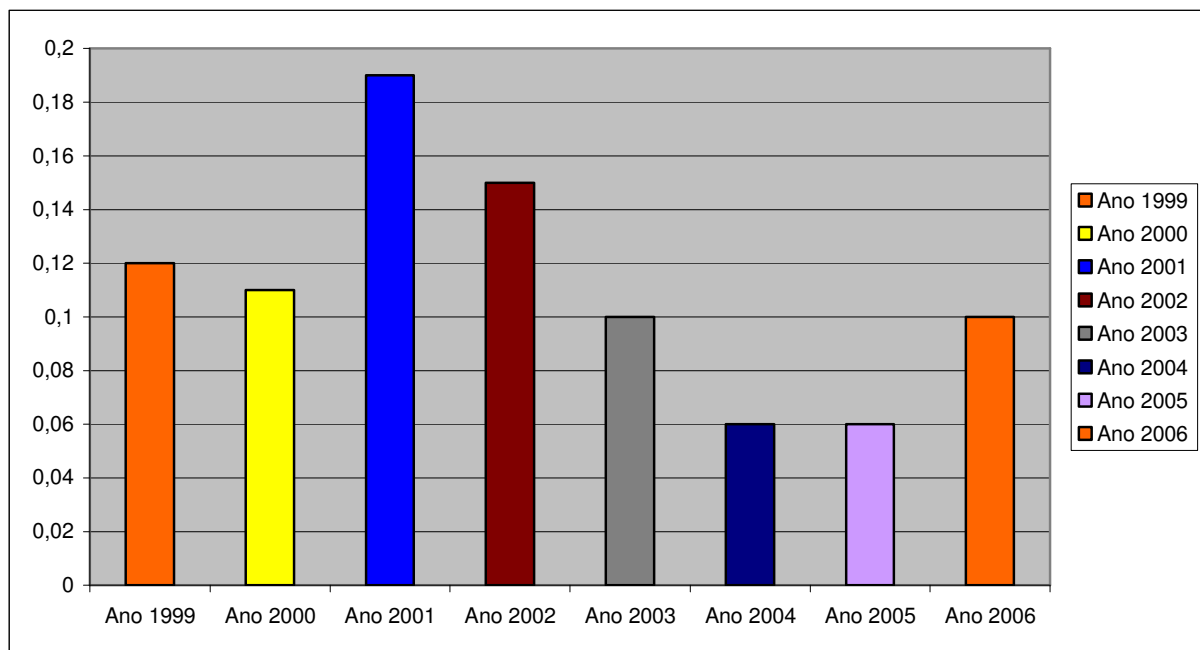


Figura 6 - Taxa de Incidência de febre Q por 10⁵ habitantes no período de 1999 a 2006 (fonte: DGS)

Em relação a estes valores de incidência, podemos compará-los com outros países europeus onde a notificação também é obrigatória. Temos que em França a taxa de incidência é de 50 casos/10⁵ habitantes. Em Inglaterra e País de Gales, a incidência oscila entre 0,15 e 0,35 casos/10⁵ habitantes⁵⁹. Um estudo realizado na antiga União Soviética, entre 1980 e 1985 demonstrou existir uma taxa de incidência de 6 casos/10⁵ habitantes⁵⁹. Em Espanha, a febre Q é de grande relevância, sendo que o País Basco é

uma das regiões espanholas com a maior incidência de casos de febre Q, pois desde 1991 já se contabilizaram 16 surtos epidémicos, que afectaram mais de 300 pessoas⁹⁶. Na Austrália, país onde foram reportados os primeiros casos de febre Q, na década de 30, a incidência da doença é de 3,1 a 4,9 casos/10⁵ habitantes⁵⁹. Podemos concluir que a incidência da doença varia bastante consoante a zona geográfica que estamos a analisar.

Quando analisamos dados referentes a notificações obrigatórias, importa verificarmos se estes dados poderão estar subestimados. Visto os casos terem de ser comunicados à DGS pelo médico que diagnostica a infecção (processo burocrático), podemos sempre ponderar se de facto não existiram casos em que o médico diagnostica e trata a doença, mas não faz a notificação à DGS. Um estudo recente realizado no Centro de Estudo de Vectores e Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (CEVDI/INSA) permitiu concluir que foram diagnosticados serologicamente naquele centro trinta e dois casos de febre Q durante os anos de 2004 e 2005⁸³. Uma rápida consulta à figura 5 permite-nos constatar que nesse período de tempo foram notificados apenas doze casos. Temos portanto um exemplo cabal de como provavelmente o número de notificações de febre Q em Portugal está subestimado.

Os dados da DGS permitem-nos ter também uma noção mais clara da distribuição geográfica dos casos notificados, como podemos depreender da análise da tabela 3.

Tabela 3 - Distribuição geográfica dos casos notificados de febre Q entre 1999 e 2006 (fonte:DGS)

Região	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Norte	0	0	1	0	0	1	0	0
Centro	1	2	3	3	4	1	2	3
Lisboa e Vale do Tejo	6	4	13	9	5	4	4	5
Alentejo	5	4	2	3	0	0	0	1
Algarve	0	1	0	0	1	0	0	1
RA Açores	0	0	0	0	0	0	0	0
RA Madeira	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	12	11	19	15	10	6	6	10

A análise destes dados permite-nos fazer algumas afirmações:

- No período de 1999 a 2006 foram notificados 89 casos de febre Q em Portugal;
- Cinquenta casos foram notificados na Região de Lisboa e Vale do Tejo;
- Apenas dois casos foram notificados na Região Norte;
- Não existiram notificações nas Regiões Autónomas dos Açores e Madeira;
- A tendência geral de diminuição nas notificações em termos absolutos também se observa na região de Lisboa e Vale do Tejo;

10. A DÁDIVA DE SANGUE EM PORTUGAL

O Instituto Português do Sangue (IPS) é a entidade que em Portugal coordena e orienta a rede nacional de transfusão de sangue, na qual está integrado juntamente com os serviços de sangue dos hospitais, do Instituto Português de Oncologia e das unidades de saúde militar.

Foi em 1958 que surgiu o primeiro organismo com responsabilidades no exercício da Medicina Transfusional, denominado Instituto Nacional do Sangue, criado pelo então Ministério do Interior – Direcção Geral da Assistência. Foi um primeiro passo, que se revelou pouco firme, pois não se alcançou uma clara definição da política estratégica e não se efectivou uma coordenação eficaz

Com o passar do tempo e com o aumentar das necessidades de sangue, bem como com o aparecimento da SIDA na década de 80 do século XX e da emergência de algumas doenças transmissíveis, as insuficiências foram sobressaindo, evidenciando a falta de eficácia da organização existente. Por outro lado, a crescente complexidade do processo e as exigências técnicas, científicas e de segurança que lhe são inerentes, obrigaram a uma redefinição da estrutura.

Em 1990 surge o decreto-lei N.º 294/90 de 21 de Setembro que cria o IPS, sendo este um organismo público dotado de personalidade jurídica e com autonomia técnica, administrativa e financeira e que integra a rede de serviços personalizados do Ministério da Saúde¹⁷.

A estrutura criada situa o IPS (com sede em Lisboa) no topo, articulado com os Centros Regionais de Sangue (CRS) de Lisboa, Porto e Coimbra. O IPS tem competências

normativas e de coordenação do sector. Os centros regionais de sangue possuem competências operacionais de colheita, processamento, distribuição e supervisão técnica regional. Os Serviços de Imunohemoterapia Hospitalares (SIH) encerram o elo da cadeia transfusional, através da uma prática global de qualidade da transfusão.

A articulação do IPS, dos CRS e dos SIH constitui o Serviço Nacional de Sangue⁴³.

Regulamento da Transfusão

A dádiva de sangue é um acto voluntário e não remunerado e está regulamentado pelo despacho N.º 19/91 de 12 de Setembro, do Ministério da Saúde. Este despacho aprova os critérios mínimos de segurança transfusional para a dádiva de sangue¹⁸.

- Quem pode dar sangue?

Podem dar sangue indivíduos saudáveis, entre 18 e 65 anos, não sendo recomendado que a primeira dádiva se efectue após os 60 anos; fora deste intervalo fica ao critério do médico que avalia o dador.

- Frequência anual das colheitas

Quatro colheitas para os homens

Três colheitas para as mulheres,

Para ambos os sexos o intervalo mínimo entre duas colheitas é de dois meses.

- Volume máximo de amostra

9 mL/kg de peso, num volume máximo de 450 mL \pm 10%, para além das amostras necessárias para análise

- Exame Médico

Cada colheita é sempre precedida de exame médico, que observará obrigatoriamente:

- Critérios para a protecção do dador: avaliação de situações que contra-indiquem a colheita, nomeadamente:

- Doenças cardíacas;
- Doenças hepáticas;
- Doenças pulmonares;
- Doenças neoplásicas;
- Tendência anormal para a hemorragia;
- Gravidez;
- Terapêutica medicamentosa;
- Anemia;
- Alterações do pulso (frequência cardíaca);
- Alterações de pressão arterial;

- Critérios para a protecção do receptor: avaliação para despiste de situações que contra-indiquem a administração do sangue, nomeadamente em relação a:

- Febre;
- Vacinações ou imunização passiva recentes;
- Comportamentos de risco para doenças transmissíveis;
- Doenças infecciosas (hepatite, sífilis, malária e SIDA);
- Intoxicação alcoólica ou por narcóticos;

- Colheita será sempre efectuada sob supervisão médica

Rastreio laboratorial de doenças transmissíveis

Todas as unidades de sangue colhidas são rastreadas laboratorialmente para várias doenças transmissíveis.

- **Sífilis:** teste de **VDRL** ou equivalente. Testes positivos deverão ser confirmados com testes treponémicos específicos como o **TPHA** ou **FTA-ABS**.

As unidades positivas deverão ser inutilizadas;

- Pesquisa do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (**AgHBs**) por métodos imuno-enzimático (ELISA) ou outro de especificidade e sensibilidade semelhantes. As unidades positivas são inutilizadas;

- Pesquisa do anticorpo contra o *core* do vírus da hepatite B (**AchBc**) por método imuno-enzimático (ELISA) ou outro de especificidade e sensibilidade semelhantes. As unidades positivas deverão ser testadas para pesquisa do anticorpo de superfície do vírus da hepatite B (**AchBs**). Se **AchBs** negativas, as unidades deverão ser inutilizadas. Se **AchBs** positivas, as unidades podem ser utilizadas;
- Pesquisa de anticorpos para o vírus da hepatite C (**AchCV**) por método imuno-enzimático ou outro de sensibilidade e especificidade semelhantes. Resultados positivos podem ser confirmados utilizando testes confirmatórios. Se os testes confirmatórios forem negativos, as unidades podem ser utilizadas;
- Determinação da enzima alanina amino transferase (**ALT**). As unidades com ALT superiores a dois desvios *standards* (2DS) são inutilizadas;
- Pesquisa de anticorpos para os vírus da imunodeficiência humana (**AchIV1 e AchIV2**) por método imuno-enzimático ou outro de especificidade e sensibilidade semelhantes. As unidades positivas são inutilizadas;

Desde 1 de Janeiro de 2003, o CRS de Lisboa efectua por rotina, em todas as unidades, a **detecção de ARN** do vírus da Hepatite C (**VHC**) e do vírus **VIH-1/2**, por uma técnica de “*transcription-mediated amplification*” (TMA). Esta metodologia permite detectar a eventual presença destes vírus nas unidades colhidas. A utilização desta técnica trouxe uma mais-valia a este processo, tendo em conta que todas as análises imunológicas (mencionadas acima) se baseiam na pesquisa de anticorpos. A detecção de ARN viral permite detectar infecções que estejam no período-janela e como tal ainda

não geraram uma resposta imunológica, com produção de anticorpos. Este facto vem de facto tornar ainda mais seguro este processo, aumentando em grande escala a segurança transfusional.

A execução de todos estes passos assegura a qualidade do sangue a ser transfundido.

Por todos estes motivos se considera o grupo dos dadores de sangue como um exemplo de população saudável, pois possui todos os requisitos previstos na lei e o seu estado de saúde enquadra-se na definição de apto para doar sangue.

III – OBJECTIVOS

O conhecimento da febre Q em Portugal é ainda relativamente escasso. Primeiro porque se trata de uma patologia de conhecimento recente (com os primeiros casos relatados na década de 30, e em Portugal apenas no final da década de 40 (do século XX) e depois porque provavelmente ainda não existe uma grande sensibilização dos clínicos para o diagnóstico desta doença. A juntar a este facto temos as características da infecção, que na maior parte dos casos é assintomática ou inespecífica, passando por isso muitas vezes despercebida. No entanto, é uma doença que tem uma taxa de mortalidade que não é negligenciável, constituindo uma ameaça considerável, principalmente para os grupos de risco.

Em termos concretos os únicos dados disponíveis são as estatísticas elaboradas anualmente pela DGS, referentes à notificação obrigatória. A febre Q passou a ser de notificação obrigatória em 1 de Janeiro de 1999, estando os dados disponíveis a partir dessa altura.

O CEVDI/INSA é um dos laboratórios que efectua o serodiagnóstico em amostras humanas, em Portugal. O centro disponibiliza nesta altura a detecção de ADN de *C. burnetii* e a pesquisa de anticorpos anti- *C. burnetii*. Devido aos requisitos em termos de condições de segurança, ainda não é possível efectuar o isolamento da bactéria por cultura, pois esta técnica requer um laboratório com nível três de segurança, sendo o actual laboratório do CEVDI/INSA de nível dois. Existirão condições de segurança para a execução desta técnica, quando o centro voltar às suas instalações de Águas de Moura, visto que desde Março de 2006 o centro se encontra a operar no Edifício

LEMES, junto ao edifício sede do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, em Lisboa, devido ao facto de as instalações de Águas de Moura (que já tinham mais de sessenta anos) estarem a ser reconstruídas.

A técnica utilizada no CEVDI/INSA para a detecção de anticorpos para *C. burnetii* é a IFI. É uma técnica fiável, que produz resultados sensíveis e específicos. É por isso a técnica de referência da OMS⁶⁷. Aquando da implementação da técnica no CEVDI/INSA foi necessário estabelecer um limiar de positividade, que definisse o título a partir do qual uma amostra seria classificada como positiva. A forma correcta de estabelecer este limiar de positividade é estudar uma amostra representativa da população saudável do país, de forma a estudar qual é a reactividade natural dessa população para o agente em causa, nomeadamente verificando se a população já teve ou não contacto com o agente e se este é ou não endémico na região em causa. Sempre que pretendemos estudar uma população dita saudável em epidemiologia, recorre-se sempre ao grupo que é de longe o mais vigiado e o que mais próximo está do conceito de “saudável”: o dador de sangue. Assim sendo, estudando uma amostra de dadores de sangue podemos aquilatar como a doença se comporta nesse grupo específico e estabelecer as bases comparativas para os resultados da restante população.

No CEVDI não foi ainda possível efectuar esse trabalho para a febre Q, por diversos motivos, nomeadamente falta de recursos financeiros e humanos. Como tal, foi adoptado o procedimento para áreas endémicas seguido por laboratórios de referência, nomeadamente a “Unité des Rickettsies, Faculté de Médecine de Marseille - Secteur Timone”, em Marselha coordenada pelo Professor Doutor Didier Raoult. O estudo no qual se baseia o procedimento utilizado no CEVDI/INSA foi realizado em 1994, por

Hervé Tissot Dupond e colaboradores⁹³ do Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Medicina de Marselha, em colaboração com a “Unité des Rickettsies”.

A adaptação deste estudo permitiu estabelecer um protocolo de estudo para as amostras que chegam ao CEVDI/INSA:

1º dia (Triagem): O soro a testar é diluído 1/50 para pesquisa de anticorpos do tipo G,A,M em fase II. Se o resultado for positivo, passamos à titulação dos anticorpos no 2º dia.

2º dia (Titulação): O soro a testar (positivo na diluição 1/50) vai ser testado a 1/200 para IgG e na diluição 1/50 para IgM em fase I e II. Se o resultado for positivo, e caso se trate de uma segunda amostra de soro do mesmo doente, são realizadas diluições seriadas para determinar o título dos anticorpos.

Segundo o estudo de Tissot Dupond, os critérios de infecção activa são definidos por:

Febre Q Aguda: Seroconversão ou aumento de 4 vezes no título de anticorpos. Um título isolado de IgG ≥ 200 e IgM ≥ 50 anti- *C. burnetii* em fase II tem um valor predictivo de 100 % para definir uma infecção activa.

Febre Q Crónica: título de IgG ≥ 800 anti - *C. burnetii* em fase I tem um valor predictivo de 98,1% para definir uma infecção activa.

É com base nestas premissas que assenta a pesquisa de anticorpos anti - *C. burnetii* realizada no Laboratório de Serologia do CEVDI/INSA.

Os objectivos deste trabalho visam estudar uma amostra de dadores de sangue de uma região portuguesa, com o objectivo de sabermos quais os anticorpos residuais existentes nessa população. Ao fazermos esta avaliação ficamos com uma noção mais correcta sobre eventuais contactos prévios dessa população com o agente. Este conhecimento permite-nos conhecer melhor a nossa população controlo e com esses dados aferir se o limiar de positividade actualmente em uso (baseado apenas em bibliografia) se adequa ao nosso país ou se eventualmente necessitará de ser ajustado, de forma a estar mais adequado à realidade portuguesa.

IV - MATERIAL E MÉTODOS

1. Selecção da Amostra

Este estudo foi realizado com o objectivo de estudar uma população de dadores de sangue. A instituição que em Portugal opera nesta área é o IPS. Este instituto está sob tutela do Estado Português e coordena as dádivas de sangue no território nacional. Possui três centros, localizados em Lisboa, Porto e Coimbra.

Como tal foram estabelecidos contactos com o Centro Regional de Sangue de Lisboa do IPS, através da sua directora, Dr.^a Gracinda de Sousa para a cedência de amostras de soro de dadores, estabelecendo-se um protocolo de colaboração, que foi assinado em Maio de 2006. Os soros de dadores fornecidos foram colhidos segundo o procedimento normal no CRS e os componentes sanguíneos obtidos a partir dessas dádivas foram considerados aptos para transfusão.

2. Escolha da região a estudar

Como já foi referido anteriormente os únicos dados concretos referentes à febre Q em Portugal são os relatórios da DGS referentes às notificações obrigatórias. Houve 89 notificações em Portugal no período entre 1999 e 2006. Constata-se que 50 dessas notificações foram feitas na região de saúde de Lisboa e Vale do Tejo (região que abrange os Distritos de Lisboa, Setúbal e Santarém). Trata-se de um valor que corresponde a 56,2% das notificações totais verificadas no país. Na impossibilidade de constituir uma amostra representativa de todo o país, devidos às limitações financeiras

do estudo, optou-se por escolher uma amostra oriunda desta zona pelo elevado índice de notificações originárias desta região de saúde.

3. Dimensão da amostra

Em qualquer estudo existem sempre limitações de ordem financeira. Este não fugiu à regra e foi essa orientação que determinou a escolha da dimensão da amostra. A disponibilização de 50 lâminas FOCUS Diagnostics para IFI, permitiu delinear um estudo com uma amostra de 150 dadores de sangue.

4. Constituição da amostra

Após escolher a região de estudo e o número de amostras a estudar, houve necessidade de conhecer um pouco mais a fundo a região em questão.

O território português continental foi dividido em cinco regiões de saúde: Norte, Centro, Lisboa e Vale do Tejo, Alentejo e Algarve. A estas juntam-se as duas regiões autónomas, Açores e Madeira.

A região de saúde de Lisboa e Vale do Tejo inclui os Distritos de Lisboa, Setúbal e Santarém.

O critério escolhido para a constituição da amostra foi o número de habitantes.

Recorrendo a dados do Instituto Nacional de Estatística (INE) recolhidos pelo Censos 2001, temos que:

Total de Habitantes de Portugal: 10.356.117

Total de Habitantes do Distrito de Lisboa: 2.136.013

Total de Habitantes do Distrito de Setúbal: 788.459

Total de Habitantes do Distrito de Santarém: 454.527

Total de Habitantes dos Distritos de Lisboa, Setúbal e Santarém: 3.378.999

Este número de habitantes desta região constitui cerca de 32,63% da população portuguesa.

No número total de habitantes da região, a contribuição de cada um dos Distritos é a seguinte:

- Lisboa: 63,21%
- Setúbal: 23,34%
- Santarém: 13,45%

Transpondo estes valores de percentagem para uma amostra de 150 soros de dadores, temos que a distribuição é a seguinte:

- Lisboa: 95 soros de dadores
- Setúbal: 35 soros de dadores
- Santarém: 20 soros de dadores

A amostra para o estudo foi assim constituída com base neste critério.

5. Processamento e identificação das amostras

As amostras foram cedidas pelo IPS em tubo primário (tubo seco). Os soros foram separados para tubos estéreis de 1,8 ml e congelados a -20°C. As amostras foram mantidas a esta temperatura até à data em que foram trabalhadas, tendo sido mantidas a 4°C (frigorífico) durante o período em que o estudo decorreu.

As amostras vinham separadas em três lotes diferentes, consoante a origem da colheita: dadores de Lisboa, dadores de Setúbal e dadores de Santarém. Cada amostra vinha identificada com numeração própria do IPS. No momento da separação do soro, as amostras foram identificadas com uma codificação mais adequada ao estudo em questão. O critério adoptado foi o seguinte:

95 amostras de Lisboa: identificadas como LX 1 a 95

35 amostras de Setúbal: identificadas como ST 1 a 35

20 amostras de Santarém: identificadas como SAN 1 a 20

6. Procedimento

As amostras deste estudo foram processadas segundo o protocolo em vigor para o diagnóstico de amostras humanas em utilização no CEVDI/INSA. Foi apenas feita uma alteração: todos os soros foram testados nas diluições 1/50 para pesquisa de anticorpos do tipo G,A,M em lâminas de fase I e II. Os soros que revelaram positividade nesta diluição foram titulados na diluição seguinte (1/100) e se voltaram a revelar positividade nesta diluição foram então titulados, de acordo com o protocolo do CEVDI/INSA, pesquisando-se anticorpos anti – *C. burnetii* do tipo IgG a partir da

diluição 1/200 e anticorpos do tipo IgM a partir da diluição 1/50. As titulações foram realizadas através de diluição seriada das amostras positivas, até se encontrar o título de cada uma delas, em lâminas FOCUS ou em lâminas de outra casa comercial (estas apenas com antígeno de fase II).

7. Reagentes

Lâminas de Imunofluorescência

Lâminas FOCUS Diagnostics: lâminas de antígeno, cada uma com 8 poços, antígeno cultivado a partir de *C. burnetii* estirpe Nine Mile. Cada poço possui dois *spots* distintos: um *spot* de antígeno em fase I e um *spot* de antígeno em fase II.

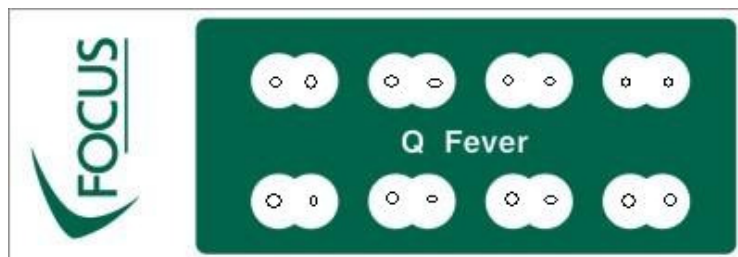


Figura 7: Lâmina de IFI Focus Diagnostics com *spots* de antígeno de fase I e II

Lâminas de outra casa comercial: lâminas de antígeno em fase II, cultivado em células Vero e inativado. Cada lâmina possui 10 poços de antígeno.

Soros Controlo

Controlo negativo e positivo de humano (ambos fornecidos no *kit* da FOCUS Diagnostics)

Conjugados

-Conjugado IgG,A,M (Total) da Dako Cytomation, anticorpo secundário policlonal produzido em coelho, direccionado para cadeias humanas de imunoglobulinas do tipo G,A,M e para as cadeias Kappa e Lambda, conjugado com fluoresceína, numa diluição de 1/50 com Azul de Evans e tampão salino fosfato pH 7,4.

-Conjugado IgG, anticorpo secundário produzido em cabra, direccionado para as imunoglobulinas humanas do tipo G, conjugado com fluoresceína (reagente fornecido no *kit* FOCUS Diagnostics)

-Conjugado IgM, anticorpo secundário produzido em cabra, direccionado contra as imunoglobulinas humanas do tipo M, conjugado com fluoresceína (reagente fornecido no *kit* FOCUS Diagnostics)

Pré-Diluyente IgM: Para a determinação dos anticorpos do tipo IgM é importante considerar que os anticorpos do tipo IgG competem com os do tipo IgM provocando falsos negativos. Para eliminar esta interferência é necessário tratar o soro previamente com este diluyente de amostra.

Tampão Salino fosfato pH 7,4 (PBS): solução salina fosfato, tamponada a pH 7,4, utilizada para diluir os soros e para efectuar as lavagens das lâminas, da GIBCO

Meio de montagem para lâminas: Glicerol tamponado com PBS a pH 7,2 ± 0,1 (reagente fornecido no *kit* FOCUS Diagnostics)

8. Diluição das amostras

A diluição das amostras foi executada em microplacas de 96 poços de fundo redondo.

As amostras foram processadas da seguinte forma para se obterem as diluições 1/50 e 1/100 para pesquisa de anticorpos do tipo Ig G,A,M:

1º poço: Pipeta-se 40 µl de diluente (PBS) e juntam-se 10 µl de soro a testar. Temos um volume final de 50 µl neste poço, estando a amostra de soro diluída 1/5 (uma parte de amostra + quatro partes de PBS)

2º poço: Pipeta-se 90 µl de diluente (PBS) e transfere-se 10 µl do soro que diluímos previamente no 1º poço. Temos um volume final de 100 µl, estando a amostra de soro diluída 1/50 (juntámos uma parte da amostra já diluída a 1/5 a nove partes de PBS)

3º poço: Pipeta-se 50 µl de diluente (PBS) e junta-se 50 µl do soro diluído a 1/50 (poço nº 2). Temos um volume final de 100 µl, com o soro a estar diluído 1/100 (juntámos uma parte da amostra já diluída a 1/50 a outra parte de PBS)

9. Procedimento para a execução da técnica de imunofluorescência indirecta

As amostras foram trabalhadas de acordo com o seguinte protocolo (em uso no CEVDI/INSA) para esta técnica:

-As lâminas são retiradas do frigorífico e devem ser estabilizadas à temperatura ambiente durante pelo menos 15 minutos antes de serem utilizadas

-Preparar as diluições das amostras como referido anteriormente

-Dispensar 20 µl de cada soro diluído no poço respectivo

-Dispensar 20 µl de controlo positivo no poço respectivo

-Dispensar 20 µl de controlo negativo no poço respectivo

-Preparar uma câmara húmida para incubação das lâminas (forrando uma placa de Petri com papel absorvente embebido em água)

-Colocar a câmara húmida com as lâminas na estufa (temperatura de incubação de 35 a 37 ° C) durante 30 ± 2 minutos

-Retirar as lâminas da estufa e cuidadosamente remover os soros de cada poço, utilizando um esguicho com PBS

-Colocar as lâminas numa tina e cobrir com PBS

-Colocar um agitador magnético no fundo da tina e colocar a tina num agitador mecânico durante dois períodos de cinco minutos, trocando de PBS entre as duas lavagens

-Passar as lâminas por água destilada e deixar secar ao ar

-Aplicar 20 µl do conjugado respectivo em cada poço

-Colocar a câmara húmida com as lâminas na estufa (temperatura de incubação de 35 a 37 ° C) durante 30 ± 2 minutos

--Retirar as lâminas da estufa e cuidadosamente remover o conjugado de cada poço, utilizando um esguicho com PBS

-Colocar as lâminas numa tina e cobrir com PBS

-Colocar um agitador magnético no fundo da tina e colocar a tina num agitador mecânico durante dois períodos de cinco minutos, trocando de PBS entre as duas lavagens

-Passar as lâminas com água destilada e deixar secar ao ar

-Montar as lâminas com meio de montagem e cobrir com uma lamela de 24 x 60 mm. Remover quaisquer bolhas de ar que se tenham formado e o excesso de meio de montagem com papel absorvente

-Observar as lâminas num microscópio de fluorescência numa ampliação final de 400x (preferencialmente no próprio dia da realização da técnica)

10. Observação microscópica

Em caso de existência de anticorpos anti-*C. burnetii* em circulação, estes ligaram-se ao antigénio fixado na lâmina e observa-se fluorescência verde-maçã, difusa por todo o campo de observação. O padrão de fluorescência é diferente consoante a fase que estamos observar é a fase I ou II.

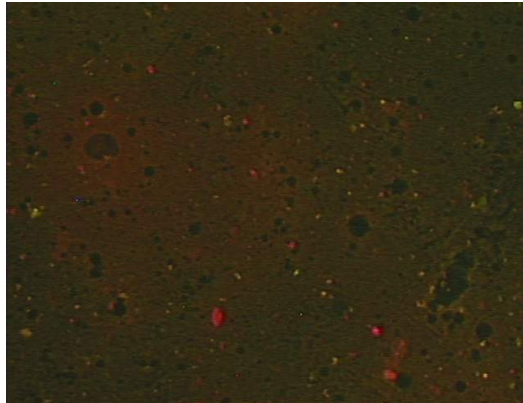


Figura 8 – Controlo Negativo, em microscopia de fluorescência. Ampliação de 400x
(fonte: FOCUS Diagnostics)

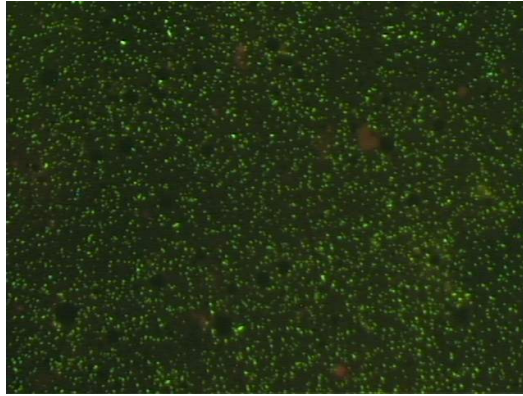


Figura 9 – Controlo positivo (fase I) em microscopia de fluorescência. Ampliação de 400x
(fonte: FOCUS Diagnostics)

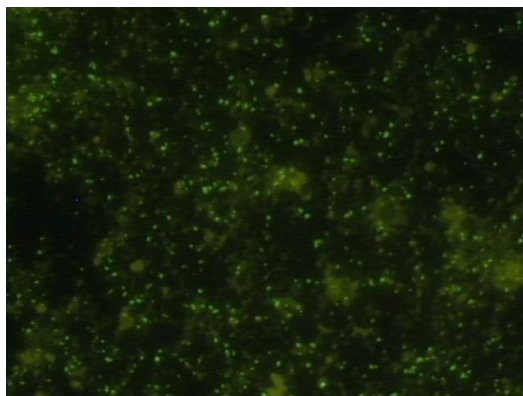


Figura 10 - Controlo positivo (fase II) em microscopia de fluorescência. Ampliação de 400 x
(fonte: FOCUS Diagnostics)

V- RESULTADOS

Os resultados obtidos no processamento das amostras estão apresentados nas tabelas 4 a 12.

- Diluição 1/50 com conjugado anti - Ig G,A,M (total)

1 - Soros de Lisboa (n=95)

Tabela 4 - Resultados de IFI na diluição 1/50 nos soros do Distrito de Lisboa

IFI 1/50 Ig Total								
Nº Laboratório	Fase I	Fase II	Nº Laboratório	Fase I	Fase II	Nº Laboratório	Fase I	Fase II
LX-1	Negativo	Negativo	LX-33	Suspeito	Negativo	LX-65	Negativo	Negativo
LX-2	Negativo	Negativo	LX-34	Negativo	Negativo	LX-66	Positivo	Positivo
LX-3	Negativo	Negativo	LX-35	Negativo	Negativo	LX-67	Negativo	Negativo
LX-4	Suspeito	Negativo	LX-36	Negativo	Negativo	LX-68	Positivo	Positivo
LX-5	Negativo	Negativo	LX-37	Negativo	Negativo	LX-69	Positivo	Suspeito
LX-6	Positivo	Positivo	LX-38	Positivo	Positivo	LX-70	Positivo	Positivo
LX-7	Negativo	Negativo	LX-39	Negativo	Negativo	LX-71	Positivo	Positivo
LX-8	Positivo	Positivo	LX-40	Negativo	Negativo	LX-72	Negativo	Negativo
LX-9	Negativo	Negativo	LX-41	Suspeito	Suspeito	LX-73	Negativo	Negativo
LX-10	Positivo	Positivo	LX-42	Negativo	Negativo	LX-74	Positivo	Positivo
LX-11	Negativo	Negativo	LX-43	Positivo	Positivo	LX-75	Negativo	Negativo
LX-12	Negativo	Negativo	LX-44	Negativo	Negativo	LX-76	Negativo	Negativo
LX-13	Positivo	Positivo	LX-45	Positivo	Positivo	LX-77	Negativo	Negativo
LX-14	Suspeito	Suspeito	LX-46	Positivo	Positivo	LX-78	Negativo	Negativo
LX-15	Suspeito	Positivo	LX-47	Suspeito	Suspeito	LX-79	Negativo	Negativo
LX-16	Suspeito	Positivo	LX-48	Positivo	Positivo	LX-80	Positivo	Positivo
LX-17	Positivo	Positivo	LX-49	Negativo	Negativo	LX-81	Suspeito	Positivo
LX-18	Positivo	Positivo	LX-50	Negativo	Negativo	LX-82	Negativo	Negativo
LX-19	Suspeito	Negativo	LX-51	Negativo	Negativo	LX-83	Negativo	Negativo
LX-20	Negativo	Negativo	LX-52	Negativo	Negativo	L-84	Negativo	Suspeito
LX-21	Negativo	Negativo	LX-53	Negativo	Suspeito	LX-85	Suspeito	Positivo
LX-22	Negativo	Negativo	LX-54	Negativo	Negativo	LX-86	Suspeito	Suspeito
LX-23	Suspeito	Positivo	LX-55	Positivo	Positivo	LX-87	Suspeito	Suspeito
LX-24	Suspeito	Suspeito	LX-56	Negativo	Negativo	LX-88	Negativo	Positivo
LX-25	Negativo	Negativo	LX-57	Suspeito	Suspeito	LX-89	Negativo	Negativo
LX-26	Negativo	Negativo	LX-58	Negativo	Negativo	LX-90	Negativo	Negativo
LX-27	Suspeito	Suspeito	LX-59	Suspeito	Positivo	LX-91	Suspeito	Positivo
LX-28	Negativo	Negativo	LX-60	Negativo	Negativo	LX-92	Negativo	Negativo
LX-29	Negativo	Negativo	LX-61	Negativo	Negativo	LX-93	Positivo	Positivo
LX-30	Negativo	Negativo	LX-62	Negativo	Negativo	LX-94	Negativo	Negativo
LX-31	Suspeito	Positivo	LX-63	Negativo	Negativo	LX-95	Negativo	Negativo
LX-32	Suspeito	Suspeito	LX-64	Positivo	Positivo			

Em 95 soros:

- Negativos e/ou Suspeitos: 65 amostras

- Positivos e Suspeitos: 30 amostras

As 30 amostras com positividade na diluição 1/50 foram testadas na diluição 1/100 com conjugado anti - Ig G,A,M. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 5.

Tabela 5 - Resultado de IFI na diluição 1/50 e 1/100 nos soros do Distrito de Lisboa

N.º Laboratório	IFI 1/50 Ig Total		IFI 1/100 Ig Total	
	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II
LX-6	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LX-8	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LX-10	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
LX-13	Positivo	Positivo	Suspeito	Positivo
LX-15	Suspeito	Positivo	Negativo	Positivo
LX-16	Suspeito	Positivo	Negativo	Suspeito
LX-17	Positivo	Positivo	Suspeito	Positivo
LX-18	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LX-23	Suspeito	Positivo	Suspeito	Positivo
LX-31	Suspeito	Positivo	Negativo	Negativo
LX-38	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LX-43	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
LX-45	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
LX-46	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
LX-48	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LX-55	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
LX-59	Suspeito	Positivo	Suspeito	Negativo
LX-64	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
LX-66	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LX-68	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LX-69	Positivo	Suspeito	Positivo	Positivo
LX-70	Positivo	Positivo	Negativo	Suspeito
LX-71	Positivo	Positivo	Negativo	Suspeito
LX-74	Positivo	Positivo	Suspeito	Positivo
LX-80	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
LX-81	Suspeito	Positivo	Suspeito	Suspeito
LX-85	Suspeito	Positivo	Negativo	Positivo
LX-88	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
LX-91	Suspeito	Positivo	Negativo	Positivo
LX-93	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo

Em 30 soros:

- Negativos e/ou Suspeitos: 7 soros
- Positivos e Suspeitos: 23 soros

Estes 23 soros foram testados segundo o protocolo até se determinarem os seus títulos. O resultado dessas titulações é apresentado na tabela 6.

Tabela 6 - Resultado das titulações de IFI para as 23 amostras tituladas do Distrito de Lisboa

N.º Laboratório	IFI 1/50 Ig Total		IFI 1/100 Ig Total		IFI Título IgG		IFI Título IgM	
	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II
LX-6	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	< 200	400	< 50	< 50
LX-8	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	< 200	< 200	< 50	< 50
LX-10	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo		200		< 50
LX-13	Positivo	Positivo	Suspeito	Positivo		< 200		< 50
LX-15	Suspeito	Positivo	Negativo	Positivo		400		< 50
LX-17	Positivo	Positivo	Suspeito	Positivo		< 200		< 50
LX-18	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	< 200	< 200	< 50	< 50
LX-23	Suspeito	Positivo	Suspeito	Positivo		< 200		< 50
LX-38	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	< 200	400	< 50	< 50
LX-43	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo		< 200		< 50
LX-46	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo		< 200		< 50
LX-48	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	200	800	< 50	< 50
LX-55	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo		< 200		< 50
LX-64	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo		< 200		< 50
LX-66	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo		400		< 50
LX-68	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	< 200	< 200	< 50	< 50
LX-69	Positivo	Suspeito	Positivo	Positivo	< 200	< 200	< 50	< 50
LX-74	Positivo	Positivo	Suspeito	Positivo		800		< 50
LX-80	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo		< 200		< 50
LX-85	Suspeito	Positivo	Negativo	Positivo		< 200		< 50
LX-88	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo		< 200		< 50
LX-91	Suspeito	Positivo	Negativo	Positivo		< 200		< 50
LX-93	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	< 200	< 200	< 50	< 50

1.1 - Resultados Finais para o Distrito de Lisboa (n=95)

1.1.1- Ig G,A,M na diluição 1/50

Negativos e/ou Suspeitos: 65 soros

Positivos e Suspeitos: 30 soros

1.1.2- Ig G,A,M na diluição 1/100

Negativos e/ou Suspeitos: 7 soros

Positivos e Suspeitos: 23 soros

1.1.3- IgG (Titulações)

Fase I: Título < 200: 7 soros

Título = 200: 1 soro

Fase II: Título < 200: 16 soros

Título = 200: 1 soro

Título = 400: 4 soros

Título = 800: 2 soros

1.1.4- IgM (Titulações)

Fase I: Título < 50: 8 soros

Título ≥ 50: 0 soros

Fase II: Título < 50: 23 soros

Título ≥ 50: 0 soros

2 - Soros de Setúbal (n=35)

Tabela 7 - Resultados de IFI na diluição 1/50 nos soros do Distrito de Setúbal

N.º Laboratório	IFI 1/50 Ig Total	
	Fase I	Fase II
ST-1	Positivo	Positivo
ST-2	Positivo	Positivo
ST-3	Positivo	Positivo
ST-4	Suspeito	Positivo
ST-5	Negativo	Positivo
ST-6	Negativo	Negativo
ST-7	Negativo	Positivo
ST-8	Negativo	Negativo
ST-9	Positivo	Positivo
ST-10	Positivo	Positivo
ST-11	Positivo	Suspeito
ST-12	Positivo	Positivo
ST-13	Positivo	Negativo
ST-14	Suspeito	Positivo
ST-15	Negativo	Suspeito
ST-16	Negativo	Negativo
ST-17	Suspeito	Suspeito
ST-18	Suspeito	Negativo
ST-19	Negativo	Negativo
ST-20	Suspeito	Positivo
ST-21	Positivo	Suspeito
ST-22	Suspeito	Suspeito
ST-23	Negativo	Negativo
ST-24	Negativo	Negativo
ST-25	Negativo	Suspeito
ST-26	Positivo	Positivo
ST-27	Negativo	Negativo
ST-28	Negativo	Negativo
ST-29	Suspeito	Negativo
ST-30	Positivo	Positivo
ST-31	Suspeito	Suspeito
ST-32	Positivo	Positivo
ST-33	Suspeito	Positivo
ST-34	Positivo	Positivo
ST-35	Suspeito	Suspeito

Em 35 soros:

- Negativos e/ou Suspeitos: 16 soros
- Positivos e Suspeitos: 19 soros

As 19 amostras positivas ou suspeitas na diluição 1/50 foram testadas na diluição 1/100 com conjugado anti-Ig G,A,M, com os seguintes resultados:

Tabela 8 - Resultados de IFI na diluição 1/50 e 1/100 nos soros do Distrito de Setúbal

N.º Laboratório	IFI 1/50 Ig Total		IFI 1/100 Ig Total	
	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II
ST-1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
ST-2	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
ST-3	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
ST-4	Suspeito	Positivo	Suspeito	Positivo
ST-5	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
ST-7	Negativo	Positivo	Negativo	Suspeito
ST-9	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
ST-10	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
ST-11	Positivo	Suspeito	Positivo	Suspeito
ST-12	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
ST-13	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
ST-14	Suspeito	Positivo	Suspeito	Positivo
ST-20	Suspeito	Positivo	Negativo	Positivo
ST-21	Positivo	Suspeito	Negativo	Positivo
ST-26	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
ST-30	Positivo	Positivo	Suspeito	Positivo
ST-32	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
ST-33	Suspeito	Positivo	Positivo	Positivo
ST-34	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

Em 19 soros:

- Negativos e/ou Suspeitos: 2 soros
- Positivos e Suspeitos: 17 soros

Estes 17 soros foram testados segundo o protocolo até se obter o seu título. O resultado dessas titulações é apresentado na tabela 9:

Tabela 9 - Resultado das titulações de IFI para as 17 amostras tituladas do Distrito de Setúbal

N.º Lab.	IFI 1/50 Ig Total		IFI 1/100 Ig Total		IFI IgG		IFI IgM	
	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II
ST-1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	< 200	200	< 50	< 50
ST-2	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	< 200	200	< 50	< 50
ST-3	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	< 200	800	< 50	< 50
ST-4	Suspeito	Positivo	Suspeito	Positivo		< 200		< 50
ST-9	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	< 200	200	< 50	< 50
ST-10	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	< 200	400	< 50	< 50
ST-11	Positivo	Suspeito	Positivo	Suspeito	< 200	< 200	< 50	< 50
ST-12	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	< 200	200	< 50	< 50
ST-13	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	< 200	< 200	< 50	< 50
ST-14	Suspeito	Positivo	Suspeito	Positivo		< 200		< 50
ST-20	Suspeito	Positivo	Negativo	Positivo		< 200		< 50
ST-21	Positivo	Suspeito	Negativo	Positivo		< 200		< 50
ST-26	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	< 200	400	< 50	100
ST-30	Positivo	Positivo	Suspeito	Positivo		< 200		< 50
ST-32	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	< 200	200	< 50	< 50
ST-33	Suspeito	Positivo	Positivo	Positivo	< 200	< 200	< 50	< 50
ST-34	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	< 200	200	< 50	< 50

2.1-Resultados Finais para o Distrito de Setúbal (n=35)

2.1.1- Ig G,A,M na diluição 1/50

Negativos e/ou Suspeitos: 16 soros

Positivos e Suspeitos: 19 soros

2.1.2- Ig G,A,M na diluição 1/100

Negativos e/ou Suspeitos: 2 soros

Positivos e Suspeitos: 17 soros

2.1.3- IgG (Titulações)

Fase I: Título < 200: 12 soros

Título ≥ 200: 0 soros

Fase II: Título < 200: 8 soros

Título = 200: 6 soros

Título = 400: 2 soros

Título = 800: 1 soro

2.1.4- IgM (Titulações)

Fase I: Título < 50: 12 soros

Título ≥ 50: 0 soros

Fase II: Título < 50: 16 soros

Título = 100: 1 soro

3 - Soros de Santarém (n=20)

Tabela 10 - Resultados de IFI na diluição 1/50 nos soros do Distrito de Santarém

N.º Laboratório	IFI 1/50 Ig Total	
	Fase I	Fase II
SAN-1	Negativo	Negativo
SAN-2	Negativo	Suspeito
SAN-3	Negativo	Suspeito
SAN-4	Negativo	Suspeito
SAN-5	Negativo	Negativo
SAN-6	Suspeito	Suspeito
SAN-7	Negativo	Negativo
SAN-8	Negativo	Positivo
SAN-9	Suspeito	Positivo
SAN-10	Negativo	Negativo
SAN-11	Negativo	Negativo
SAN-12	Negativo	Suspeito
SAN-13	Negativo	Suspeito
SAN-14	Positivo	Positivo
SAN-15	Negativo	Negativo
SAN-16	Positivo	Positivo
SAN-17	Negativo	Negativo
SAN-18	Negativo	Positivo
SAN-19	Negativo	Negativo
SAN-20	Negativo	Negativo

Em 20 soros:

- Negativos e/ou Suspeitos: 15 soros

- Positivos e Suspeitos: 5 soros

As 5 amostras positivas ou suspeitas na diluição de 1/50 foram testadas na diluição 1/100 com conjugado anti- IgG,A,M, com os seguintes resultados:

Tabela 11: Resultados de IFI na diluição 1/50 e 1/100 nos soros do Distrito de Santarém

N.º Laboratório	IFI 1/50 Ig Total		IFI 1/100 Ig Total	
	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II
SAN-8	Negativo	Positivo	Suspeito	Positivo
SAN-9	Suspeito	Positivo	Negativo	Positivo
SAN-14	Positivo	Positivo	Suspeito	Positivo
SAN-16	Positivo	Positivo	Suspeito	Suspeito
SAN-18	Negativo	Positivo	Suspeito	Suspeito

Em 5 soros:

- Negativos e/ou Suspeitos: 2 soros
- Positivos e Suspeitos: 3 soros

Estes 3 soros foram testados segundo o protocolo até se obter o seu título. O resultado dessas titulações é apresentado na tabela 12:

Tabela 12 - Resultado das titulações de IFI para as 3 amostras tituladas do Distrito de Santarém

N.º Lab.	IFI 1/50 Ig Total		IFI 1/100 Ig Total		IFI Ig G		IFI Ig M	
	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II
SAN-8	Negativo	Positivo	Suspeito	Positivo	---	< 200	---	< 50
SAN-9	Suspeito	Positivo	Negativo	Positivo	---	< 200	---	< 50
SAN-14	Positivo	Positivo	Suspeito	Positivo	---	< 200	---	< 50

3.1 - Resultados Finais para o Distrito de Santarém (n=20)

3.1.1 - Ig G,A,M na diluição 1/50

Negativos e/ou Suspeitos: 15 soros

Positivos e Suspeitos: 5 soros

3.1.2 - Ig G,A,M na diluição 1/100

Negativos e/ou Suspeitos: 2 soros

Positivos e Suspeitos: 3 soros

3.1.3 - IgG (Titulações)

Fase II: Título < 200: 3 soros

Título ≥ 200: 0 soros

3.1.4 - IgM (Titulações)

Fase II: Título < 50: 3 soros

Título ≥ 50: 0 soros

4- Resultados Totais

4.1- Ig G,A,M na diluição 1/50

Negativos e/ou Suspeitos: 96 soros

Positivos e Suspeitos: 54 soros

4.2- Ig G,A,M na diluição 1/100

Negativos e/ou Suspeitos: 11 soros

Positivos e Suspeitos: 43 soros

4.3- IgG (Titulações)

Fase I: Título < 200: 19 soros

Título ≥ 200: 1 soro

Fase II: Título < 200: 27 soros

Título = 200: 7 soros

Título = 400: 6 soros

Título = 800: 3 soros

4.4- IgM (Titulações)

Fase I: Título < 50: 20 soros

Título ≥ 50: 0 soros

Fase II: Título < 50: 42 soros

Título = 100: 1 soro

5 - Titulação dos soros positivos na triagem

Após esta primeira fase de rastreio, foram titulados 43 soros positivos para IgG e IgM, sendo 23 de Lisboa, 17 de Setúbal e 3 de Santarém. As diluições iniciais foram 1/200 para IgG e 1/50 para IgM. Destes 43 soros, 20 apresentaram positividade para fase I e II, enquanto os restantes 23 apenas demonstraram positividade para fase II, tendo apenas sido estudada essa fase. Nas tabelas 13 e 14 estão apresentados esses resultados.

5.1 - Fase I, IgG e IgM

Tabela 13 – Número e percentagem de soros titulados em fase I e II, por Distrito e no total da amostra

Distrito	N.º de soros titulados em fase I e II	Percentagem em relação a todos os soros titulados no Distrito
Lisboa	8	34,7 %
Setúbal	12	70,6 %
Santarém	0	0 %
Total	20	46,5 %

Os resultados obtidos indicaram que 19 dos 20 soros testados apresentaram título IgG inferior a 200 (95% por cento do total). Apenas uma amostra do Distrito de Lisboa apresentou título IgG de 200.

Todos os soros estudados em fase I apresentaram título IgM inferior a 50.

No Distrito de Santarém não houve qualquer soro com positividade em fase I.

5.2 - Fase II, IgG

Tabela 14 – Título IgG em fase II, por Distrito e no total dos soros titulados

Distrito	Título < 200	Título = 200	Título = 400	Título = 800	Total soros titulados
Lisboa	16	1	4	2	23
Setúbal	8	6	2	1	17
Santarém	3	0	0	0	3
Total	27	7	6	3	43

No total da amostra, 27 dos 43 soros titulados apresentaram título IgG inferior a 200 (62,8%). Apenas em 16 soros foram obtidos títulos iguais ou superiores a 200, sendo que 7 deles tinham 200 como título, 6 tinham título 400 e apenas 3 obtiveram título IgG igual a 800.

5.3 - Fase II, IgM

Foram titulados 43 soros para pesquisa de IgM, dos quais 42 obtiveram título inferior a 50 (percentagem de 97,6%) e apenas um soro, do Distrito de Setúbal apresentou título IgM igual a 100.

VI – DISCUSSÃO

Na amostra analisada neste estudo, 96 dos 150 soros testados não tinham anticorpos em circulação para *C. burnetii*, na diluição 1/50. Este valor corresponde a uma percentagem de 64%, sendo que 65 soros eram do Distrito de Lisboa, 16 do Distrito de Setúbal e 15 provenientes de Santarém. Comparando o número de negativos com o total de população do Distrito em causa, temos que em Lisboa existe uma percentagem de seronegatividade de 68,4%, em Setúbal de 45,7% e em Santarém de 75%.

Os resultados obtidos por Distrito são um pouco díspares. O Distrito de Lisboa, cujo total de população é o maior dos três Distritos em estudo, com 63,4% dos habitantes *versus* 23,3% de Setúbal e 13,3% de Santarém, contribui de forma decisiva para o resultado obtido em termos totais. Lisboa e Santarém apresentam valores aproximados em termos de seronegatividade da população, sendo Setúbal o Distrito onde esta é menor, cifrando-se abaixo dos 50%. O Distrito de Lisboa é aquele que se aproxima mais do valor médio.

Se considerarmos a diluição 1/100 como base de estudo, temos que a seronegatividade sobe em Lisboa para 75,8% (mais sete negativos), em Setúbal para 51,4% (mais dois negativos) e em Santarém para 85% (mais dois negativos). Assistimos nesta diluição a um aumento do número de amostras negativas. Houve um aumento de 7,4% em Lisboa, 5,7% em Setúbal e de 10% em Santarém, para um aumento de 7,3% em

termos totais. Observamos novamente que o Distrito de Lisboa é o que se aproxima mais dos valores da média da população.

A comparação dos resultados obtidos nas diluições 1/50 e 1/100 permite-nos perceber que houve um aumento de 64 para 71,3 na percentagem de soros negativos. Existem nesta amostra 11 soros que testaram positivo na diluição 1/50 e negativo na diluição 1/100, estando o seu título de anticorpos entre 50 e 100.

Estes resultados permitem concluir que a escolha da diluição 1/100 como *cut-off* permite detectar mais 7,4% de soros negativos, em relação à diluição 1/50, nesta população (107 soros a 1/100 contra 96 soros a 1/50).

Analisando os resultados obtidos neste estudo, podemos ainda constatar que além dos 107 soros negativos (considerando as diluições 1/50 e 1/100), temos ainda vários soros com positividade, mas cujos títulos se situaram abaixo de 200 para IgG e abaixo de 50 para IgM (limiares de positividade definidos por Tissot Dupont⁹³ e colaboradores no seu estudo). Este resultado foi observado em 27 soros (16 de Lisboa, 8 de Setúbal e 3 de Santarém).

No Distrito de Santarém, onde foram titulados três soros para IgG e IgM (fase I e II) a 1/200 e 1/50, os resultados das titulações foram negativos, não se detectando qualquer dador com título IgG igual ou superior a 200 e IgM igual ou superior a 50 (em fase I ou II).

Tissot Dupont e colaboradores consideram no seu estudo que a obtenção de títulos de anticorpos IgG de fase II iguais ou superiores a 200 e IgM iguais ou superiores a 50 são 100% predictivos de febre Q aguda. Já em relação a anticorpos de fase I, o título considerado é igual ou superior a 800 para o tipo IgG, que segundo o autor é predictivo com uma confiança de 98% para febre Q crónica⁹³.

Enquadrando os resultados obtidos neste trabalho com o trabalho de Tissot Dupont e colaboradores, temos que o dador ST-26 apresenta títulos sugestivos de febre Q aguda (IgG 400 e IgM 100 em fase II). É também o único soro que apresenta título positivo de anticorpos IgM, já que todos os restantes 149 soros foram negativos.

Nos restantes soros titulados (n=16) onde o título IgG em fase II é igual ou superior a 200, os títulos IgM obtidos foram negativos e como tal, não se enquadram na definição de doença estabelecida pelo autor e apenas indiciam contacto anterior com o agente.

Em relação aos vinte soros onde foram titulados anticorpos de fase I, apenas o dador LX-48 apresentou título IgG igual a 200, o que não é indicativo de febre Q crónica, de acordo com os critérios de Tissot Dupont.

VII – CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo sugerem-nos que *Coxiella burnetii* será endémica em Portugal continental. A elevada percentagem de seropositividade (28,7%) obtida numa população tendencialmente saudável leva-nos a extrapolar que o agente existirá disseminado pelas diferentes regiões do país. Na população em estudo, houve diferenças nos resultados obtidos em cada um dos Distritos, sendo que a taxa de seropositividade foi mais elevada no Distrito de Setúbal e Santarém apresentou a taxa mais baixa das três regiões em estudo. Os dados da DGS não permitem saber a origem dos casos notificados por Distrito, de forma a sabermos se a tendência observada neste estudo é concordante com os dados oficiais.

Considerando que esta infecção tem com principal forma de transmissão a via aérea, através da inalação de partículas libertadas por animais infectados e havendo por isso uma associação implícita à ruralidade (pastoreio, explorações animais e agrícolas, actividades mais comuns no interior do país), essa tendência não se vê reflectida nos resultados obtidos, já que os dois Distritos situados no litoral (Lisboa e Setúbal) apresentam seropositividade superior à obtida no distrito de Santarém que é mais interior. Obviamente que os resultados no Distrito de Santarém poderão estar enviesados, devido à reduzida quantidade de soros que foram estudados, mas essa proporção reflecte a diferença em termos de total de população em relação aos outros dois Distritos e como tal deve ser considerada nestas conclusões. Seria interessante conhecer a realidade do restante território, nomeadamente a situação na ilha da Madeira e no arquipélago dos Açores, locais onde nunca existiram notificações da

doença. Após a análise deste trabalho fica ainda uma maior convicção de que a febre Q em Portugal está de facto sub-notificada.

Fazendo uma comparação dos resultados obtidos com outros estudos realizados em população portuguesa, temos que o trabalho publicado por Maria Regina Mendes e colaboradores⁶³ em 1989 e que comparava uma população de alto risco com uma população urbana, apresentando seropositividade de 47,9% e 14%, respectivamente e considerando apenas a população urbana como referencial comparativo, temos que na nossa população esse seropositividade duplicou. No trabalho efectuado por Armindo Filipe e colaboradores²⁷, o estudo de 487 soros de população do sul de Portugal originou um resultado ainda mais baixo em termos de seropositividade (2,2%), valor muito abaixo do obtido neste trabalho.

Tal como nesta dissertação, existem trabalhos publicados que descrevem a seroprevalência desta infecção, em populações de dadores de sangue e utilizando a imunofluorescência indirecta como técnica de referência. Em 1995 Letaief e colaboradores⁴⁸ estudaram 500 soros e encontraram uma prevalência de anticorpos anti – *C. burnetii* de 26%. Neste estudo os dadores com títulos Ig G,A,M iguais ou superiores a 50 foram considerados positivos e titulados para IgG, IgM e IgA isoladamente, em fase I e II. Estes resultados demonstraram uma elevada seroprevalência de anticorpos anti – *C. burnetii* na região tunisina estudada, país onde *C. burnetii* parece ser endémica, apesar de a realidade da Tunísia também estar ainda pouco estudada, tal como em Portugal. Outro trabalho mais recente, realizado por Bartolomé e colaboradores⁵ em Julho de 2007, estudou a seroprevalência de anticorpos anti – *C. burnetii* em 863 amostras de dadores de sangue da província de Albacete,

Espanha. Os resultados obtidos demonstraram também uma elevada percentagem de seropositivos (23,1% com título IgG positivo e destes 0,3% com título IgM positivo). Consideraram-se positivos os soros que obtiveram título igual ou superior a 80, tendo sido obtidos os títulos IgG e IgM. Este trabalho apenas estudou anticorpos de fase II. Estes resultados indicam que a febre Q é endémica nesta província espanhola.

A pertinência da realização destes estudos de seroprevalência em populações saudáveis como método para determinar a realidade da infecção na região é assim reforçada. Mais ainda permitem a utilização destes critérios para aumentar a sensibilidade e a fidelidade dos resultados laboratoriais obtidos quando os soros a estudar são oriundos de indivíduos com suspeita de febre Q.

Apesar das descrições existentes na bibliografia de possíveis reacções cruzadas nesta técnica nomeadamente com *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae* e *Legionella micdadei*, os reagentes utilizados foram testados pelo fabricante noutros soros positivos para Rickettsiales e os resultados obtidos indicaram uma especificidade de 100% para as lâminas de antigénio utilizadas neste trabalho. Por isso, consideramos que a seropositividade observada dever-se-á à presença em circulação de anticorpos anti – *C. burnetii* e não à existência de reacções cruzadas com outros agentes, apesar de não podermos excluir completamente essa possibilidade.

O facto de termos na nossa amostra um caso sugestivo de febre Q aguda é uma boa constatação de como a maior parte das infecções provocadas por este agente são assintomáticas. Recorde-se que se trata de um dador que fez uma consulta médica prévia à dádiva, tendo sido avaliado por um clínico e tendo passado com sucesso por

todas as etapas definidas pelo IPS como necessárias para a dádiva ser utilizável. Apesar disso e apesar de existirem descritos na literatura casos de transmissão do agente por transfusão sanguínea¹⁰, pensa-se que esta via de infecção não terá grande relevância para a Saúde Pública. De qualquer forma, a pesquisa de anticorpos para *C. burnetii* em amostras de dadores poderá ser uma forma de assegurar uma maior segurança transfusional.

Com os dados obtidos neste trabalho é possível aumentar o *cut-off* actualmente em uso no CEVDI/INSA, alterando a diluição de triagem das amostras para diagnóstico, passando a utilizar a diluição 1/100 em vez da actual 1/50. O aumento da percentagem de seronegativos entre estas duas diluições cifrou-se em 7,3%, sem perda de sensibilidade aceitando-se 1/100 como diluição de base para o serodiagnóstico da febre Q.

Após a conclusão deste trabalho estabelece-se como meta o conhecimento mais amplo da realidade da febre Q em Portugal, nomeadamente nas regiões onde existem poucas ou nenhuma notificações. Outros tipos de estudos poderão ser realizados no novo laboratório nível três de segurança biológica do CEVDI/INSA nas novas instalações de Águas de Moura, a inaugurar durante o primeiro semestre de 2008. A possibilidade de começar a realizar ensaios de isolamento do agente por rotina, a partir de amostras humanas dar-nos-á certamente muito mais conhecimentos sobre a realidade, nomeadamente que estirpes existem em circulação e quais os seus efeitos na população portuguesa. Neste momento já existe uma estirpe de *C. burnetii* no CEVDI/INSA que foi isolada acidentalmente a partir de uma amostra de sangue de um doente recebido para despiste de *Anaplasma phagocytophilum*⁸⁴.

Em termos pessoais, o objectivo mais imediato será a divulgação deste trabalho, colocando os dados obtidos à disposição de toda a comunidade científica, nacional e internacional, publicando-os numa revista com impacto a nível de Saúde Pública.

VIII – BIBLIOGRAFIA

1. **Aitken I.D., Bogel K., Cracea E. et al.** 1987. Q fever in Europe : current aspects of aetiology, epidemiology, human infection, diagnosis and therapy. *Infection*. **15**:323-27.
2. **Antoine J.C., Prina E., Jouanne C., Bongrand P.** 1990. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infect. Immun.* **58**(3):779-87.
3. **ATTC.** <http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/catalog/cellBiology/cellBiologyIndex.cfm>, acedido em 21 de Janeiro de 2008, às 15h47m.
4. **Babudieri B.** 1959. Q fever: a zoonosis. *Adv. Vet.. Sci.* **5**:81.
5. **Bartolomé J., Riquelme E., Hernández-Pérez N. et al.** 2007. Seroepidemiología de la infección por *Coxiella burnetii* en donantes de sangre en Albacete. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **25**(6):382-6.
6. **Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) – 5th Edition**, US Department of Health, Centers for Disease Control and Prevention and National Institute of Health, February ,2007.
7. **Bossi P., Van Loock F., Tegnell A., and Gouvras G.** 2004. Bichat clinical guidelines for bioterrorist agents. *Euro Surveill.* **9**(12):1-5.
8. **Brouqui P., Badiaga S. and Raoult D.** 2004. Q fever outbreak in homeless shelter. *Emerg Inf Dis.* **10** (7): 1297-9.
9. **Burnet F.M., and Freeman M.** 1937. Experimental studies on the virus of Q fever. *Med J Aust.* **2**:299-302.
10. **Canadian Diseases Weekly Report.** 1977. Comment on Q fever transmitted by blood transfusion-United States. *Can. Dis. Wkly. Rep.* **3**:210.
11. **Carmo G., Reis A.P., and Abreu J.F.** 1989. Biópsia hepática: exame complementar de grande interesse no diagnóstico da febre Q. A propósito de um caso clínico. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas.* **12**(3): 193-96.
12. **Castaneda M.R.** 1930. A new stain for *Rickettsia* bodies. *J. Infectious Diseases.* **47**:416-417.

13. **CDC.** Emerging Preparedness & Response. <http://bt.cdc.gov>, acessido em 29 de Janeiro de 2008 às 02h29m.
14. **CDC.** Q fever. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvdr/fever>, actualizado em 13 de Fevereiro de 2003 e acessido em 28 de Janeiro de 2008, às 20h13m.
15. **Center for Food Security and Public Health.** <http://www.cfsph.iastate.edu>, acessido em 29 de Janeiro de 2008 às 02h32m.
16. **Cox H.R. and Bell E.J.** 1939. The cultivation of *Rickettsia diaporica* in tissue culture and in the tissues of developing chicken embryos. Public Health Rep. **54**:2171-75.
17. **Decreto-lei N.º 294/90.** 1990. Diário da República de 21 de Setembro. **219**:3919-27
18. **Despacho do Ministério da Saúde n.º 19/91.** 1991. Diário da República de 12 Setembro. **210**: 9175-76.
19. **Derrick E.H.** 1937. “Q” Fever, new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. Med J Aust. **2**:281-99.
20. **Doenças de Declaração Obrigatória 1995-1999.** Regiões e Sub-Regiões de Saúde no Continente e Regiões Autónomas. Direcção Geral de Saúde, Lisboa, 2000.
21. **Doenças de Declaração Obrigatória 2000-2004.** Regiões e Sub-Regiões de Saúde no Continente e Regiões Autónomas. Direcção Geral de Saúde, Lisboa, 2005. pág. 29.
22. **Doenças de Declaração Obrigatória 2002-2006.** Regiões e Sub-Regiões de Saúde no Continente e Regiões Autónomas. Direcção Geral de Saúde, Lisboa, 2007. pág. 30.
23. **Dupuis G., Petite J., Peter O. and Vouilloz M.** 1987. An important outbreak of human Q fever in a Swiss alpine valley. Int J Epidemiology. **16**(2):282-87.
24. **Dyer, R.E.** 1938. A filter passing agent isolated from ticks. IV. Human infection. Public Health Rep. **53**: 2277-82.
25. **Ellis M.E., Smith C.C. and Moffat M.A.** 1983. Chronic or fatal Q-fever infection: a review of 16 patients seen in North-East Scotland (1967-80). Q J Med. **52**(205):54-66.
26. **Field P.R., Hunt J.G. and Murphy A.M.** 1983. Detection and persistence of specific IgM antibody to *Coxiella burnetii* by enzyme-linked immunosorbent assay: a comparison with immunofluorescence and complement fixation tests. J Infect Dis. **148**(3):477-87.
27. **Filipe, A.R., Bacellar, F. e David de Morais, J.A.** 1990. Anticorpos contra *Rickettsiae* na população do sul de Portugal. Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas. **13**(2): 85-9.

28. **Finidori J.P., Raoult D., Bornstein N. and Fleurette J.** 1992. Study of cross-reaction between *Coxiella burnetii* and *Legionella pneumophila* using indirect immunofluorescence assay and immunoblotting. *Acta Virol (Praha)*. **36**: 459-465.
29. **Fishbein D.B., and Raoult D.** 1992. A cluster of *Coxiella burnetii* infections associated with exposure to vaccinated goats and their unpasteurized dairy products. *Am J Trop Med Hyg.* **47**(1): 35-40.
30. **Fonseca F., Pinto M.R., Fraga de Azevedo J., e Lacerda M.T.** 1949. Febre Q em Portugal. *Revista Clínica Contemporânea, Tomo III, n.º 21*: 1159-64.
31. **Fonseca F., Pinto M.R., Fraga de Azevedo J., e Lacerda M.T.** 1949. Febre Q em Portugal. *Revista Clínica Contemporânea, Tomo I, n.º 22*: 1218-27.
32. **Fournier P.E., Casalta J.P., Habib G., Messana T. and Raoult D.** 1996. Modification of the diagnostic criteria proposed by the Duke Endocarditis Service to permit improved diagnosis of Q fever endocarditis. *Am. J. Med.* **100**(6):629-33.
33. **Fournier P.E., Marrie T.J. and Raoult D.** 1998. Diagnosis of Q fever. *J Clin Microbiol.* **36**(7):1823-34.
34. **Giménez, D.F.** 1964. Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. *Stain Technol.* **39**:135-40.
35. **Gouriet F., Fenollar F., Patrice J.Y., Drancourt M., and Raoult. D.** 2005. Use of Shell-Vial Cell Culture Assay for Isolation of Bacteria from Clinical Specimens: 13 years of Experience. *J Clin Microbiol.* **43**(10): 4993-5002.
36. **Greenslade E., Beasley R., Jennings L., Woodward A., and Weinstein P.** 2003. Has *Coxiella burnetii* been introduced into New Zealand? Letter to the editor. *Emerging Infectious Diseases.* **9**(1):138-40.
37. **Grile E., Socan M., Koren N., Avsic T., Pogacnik M. And Kraigher A.** 2007. Outbreak of Q fever among a group of high school students in Slovenia, March-April 2007. **12**(7):E070719.1
38. **Hackstadt T., Peacock M.G., Hitchcock P.J. and Cole RL.** 1985. Lipopolysaccharide variation in *Coxiella burnetii*: intrastain heterogeneity in structure and antigenicity. *Infect Immun.* **48**(2):359-65.
39. **Hackstadt T.** 1990. The role of lipopolysaccharides in the virulence of *Coxiella burnetii*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **590**:27-32.

40. **Herr S., Huchzermeyer H.F., Te Brugge L.A., Williamson C.C., Roos J.A. and Schiele G.J.** 1985. The use of a single complement fixation test technique in bovine brucellosis, Johne's disease, dourine, equine piroplasmiasis and Q fever serology. Onderstepoort J Vet Res. **52**(4):279-82.
41. **Hilbink F., Penrose M., Kováčová E., and Kazár J.** 1993. Q fever is absent from New Zealand. Int Epidemiol. **22**(5):945-949.
42. **Ho T., Htwe K.K., Yamasaki Y. et al.** 1995. Isolation of *Coxiella burnetii* from dairy cattle and ticks, and some characteristics of the isolates in Japan. Microbiol. Immunol. **39**: 663-671.
43. **Instituto Português do Sangue.** <http://www.ipsangue.org/maxcontent-documento-50.html>, acessado em 22 de Janeiro de 2008, às 10h55m
44. **Klee S.R., Tyczka J., Ellerbrok H., Franza T., Linke S., Baljer G. and Appel B.** 2006. Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. BMC Microbiol. **6**:2.
45. **Krieg N.R., and Holt J.G.** 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins. **1**.
46. **La Scola B., and Raoult D.** 1996. Serological cross-reactions between *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae*, and *Coxiella burnetii*. J Clin Microbiol. **34**:2270-4.
47. **La Scola B., Lepidi H. and Raoult D.** 1997. Pathologic changes during acute Q fever: influence of the route of infection and inoculum size in infected guinea pigs. Infect Immun. **65**(6):2443-7.
48. **Letaief A.O., Yacoub S., Dupont H.T., Le Cam C., Ghachem L., Jemni L. and Raoult D.** 1995. Seroepidemiological survey of rickettsial infections among blood donors in central Tunisia. Trans R Soc Trop Med Hyg. **89**(3):266-8.
49. **Madariaga M.G., Rezai K., Trenholme G.M., and Weinstein R.A.** 2003. Q fever: a biological weapon in your backyard. Lancet Infect Dis. **3**(11): 709-21.
50. **Maltezou H., and Raoult D.** 2002. Q fever in children. Lancet Infect Dis. **2**(11):686-91.
51. **Marazuela M., Moreno A., Yebra M., Cerezo E., Gomez-Gesto C., and Vargas J.A.** 1991. Hepatic fibrin-ring granulomas: a clinicopathologic study of 23 patients. Hum Pathol. **22**(6): 607-613.
52. **Marmion B.P., and Stoker M.G.** 1950. Q fever in Great Britain: epidemiology of an outbreak. Lancet. **2**(22):611-16.

53. **Marrie T.J.** 1988. Q fever, clinical signs, symptoms and pathophysiology. In: Walker, D.H.(Ed.), *Biology of Rickettsial Diseases*, vol. II. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1-16.
54. **Marrie T.J.** 1990. Q fever in octogenarians. *Ann NY Acad Sci.* **590**:266-270.
55. **Marrie T.J.** 1995. *Coxiella burnetii* (Q fever) pneumonia. *Clin Infect Dis.* **21**(3): 253-64.
56. **Marrie, T.J. and Raoult. D.** 1997. Q fever – a review and issues for the next century. *Int J Antimicrobial Agents.* **8**:154-61.
57. **Marrie T.J.** 2003. *Coxiella burnetii* pneumonia. *Eur Respir J.* **21**:713-19.
58. **Maurin M., Benoliel A.M., Bongrand P. and Raoult D.** 1992. Phagolysosomal alkalization and the bactericidal effect of antibiotics: the *Coxiella burnetii* paradigm. *J Infect Dis.* **166**(5):1097-102.
59. **Maurin M. and Raoult D.** 1999. Q fever. *Clin Microbiol Rev.* **12**(4):518-53.
60. **Mayer, G.** Bacteriology – Chapter Twenty One: *Rickettsia*, *Orientia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Coxiella* and *Bartonella*. Microbiology and Immunology On-line. University of South Carolina School of Medicine, acedido online em <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/rickettsia.htm>, em 12-12-2007 às 17h03m.
61. **McQuiston J.H., Childs J.E., Thompson H.A.** 2002. Q fever. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* **221**:796-99.
62. **Mendes M.R., Carmona M.H., Malva A., e Souza, R.D.** 1989. Febre Q. Estudo retrospectivo (casuística do Serviço de Doenças Infecto-Contagiosas do Hospital de Santa Maria). *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas.* **12**(3): 149-57.
63. **Mendes M.R., Carmona M.H., Malva A. et al.** 1989. Estudo seroepidemiológico da Febre Q numa população urbana e numa população de alto risco do Distrito de Lisboa. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas.* **12** (3): 159-162.
64. **Milazzo A., Hall R., Storm P.A., Harris R.J., Winslow W., and Marmion B.P.** 2001. Sexually transmitted Q fever. *Clin Infect Dis.* **33**(3): 399-402.
65. **Musso D., and Raoult D.** 1997. Serological cross-reactions between *Coxiella burnetii* and *Legionella micdadei*. *Clin Diagn Lab Immunol.* **4**: 208-11.
66. **Nguyen S.V., and Hirai K.** 1999. Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by sequence determination and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of isocitrate dehydrogenase gene. *FEMS Microbiol Lett.* **180**: 249-54.

67. **O.M.S.** 1959. Working Group on Rickettsial Diseases-Rickettsiosis: a continuing disease problem. Bulletin of the World Health Organization. **2(60)**: 157-64.
68. **O.M.S.** Health aspects of chemical and biological weapons, 1st edition, 1970
69. **Palmer S.R. and Young S.E.** 1982. Q-fever endocarditis in England and Wales, 1975-81. Lancet. **2(8313)**:1448-9.
70. **Palmer N.C., Kierstead M., Key D.W., Williams J.C., Peacock M.G. and Vellend H.** 1983. Placentitis and Abortion in Goats and Sheep in Ontario Caused by *Coxiella burnetii*. Can. Vet. J. **24(2)**:60-61.
71. **Pedoe, H.D.** 1970. Apparent recurrence of Q fever endocarditis following homograft replacement of aortic valve. Br. Heart J. **32**:568-70.
72. **Péter O., Dupuis G., Peacock M.G. and Burgdorfer W.** 1987. Comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Complement Fixation and Indirect Fluorescent-Antibody Tests for Detection of *Coxiella burnetii* antibody. J Clin Microbiol. **25(6)**: 1063-1067.
73. **Phillip C.B.** 1948. Comments on the name of the Q fever organism. Public Health Rep. **63**:58-9.
74. **Pinto M.R.** 1949. Febre Q. Jornal do Médico. **13**:305-311.
75. **Powell O.W., Kennedy K.P., McIver M. and Silverstone H.** 1962. Tetracycline in the treatment of "Q" fever. Australas Ann Med. **11**:184-8.
76. **Raoult D., Levy P.Y., Harlé J.R., et al.** 1990. Chronic Q fever: diagnosis and follow-up. Ann. N.Y. Acad Sci. **590**:51-60.
77. **Raoult D., Torres H. and Drancourt M.** 1991. Shell-vial assay: evaluation of a new technique for determining antibiotic susceptibility, tested in 13 isolates of *Coxiella burnetii*. Antimicrob. Agents Chemother. **35(10)**:2070-7.
78. **Raoult D.** 1993. Treatment of Q Fever. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **37(9)**: 1733-36.
79. **Raoult D., Levy P.Y., Tissot Dupont H., Chicheportiche C., Tamalet C., Gastaut J.A. and Salducci J.** 1993. Q fever and HIV infection. AIDS. **7**:81-6.
80. **Raoult D., and Stein A.** 1994. Q fever during pregnancy – A risk for women, foetuses and obstetricians. N Engl J Med. **330(3)**:371
81. **Raoult D. and Marrie T.** 1995. Q fever. Clin. Infect. Dis. **20(3)**:489-96.

82. **Raoult D., Tissot Dupont H., Foucault C. et al.** 2000. Q Fever 1985-1998. Clinical and epidemiological features of 1,383 infections. *Medecine*. 79(2) : 109-123.
83. **Santos A.S., Bacellar F., França A.** 2007. Febre Q: revisão de conceitos. *Medicina Interna*. 14(2): 90-100.
84. **Santos A.S.** 2007. *Anaplasma phagocytophilum* and human granulocytic anaplasmosis in Portugal. Tese de Doutoramento. Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Universidade Nova de Lisboa. 302 pp.
85. **Sawyer L., Fishbein D., and McDale D.** 1987. Q fever: current concepts. *Rev. Infect Dis*. 9:935-46.
86. **Schmeer N., Müller P., Langel J., Krauss H., Frost J.W. and Wieda J.** 1987. Q fever vaccines for animals. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. [A]*. 1987 267(1):79-88.
87. **Schramek S., and Mayer H.** 1982. Different sugar compositions of lipopolysaccharides isolated from phase I and pure phase II cells of *Coxiella burnetii*. *Infect Immunol*. 38:53-57.
88. **Scott G.H. and Williams J.C.** 1989. Inactivation of *Coxiella burnetii* by gamma irradiation. *J Gen Microbiol*. 135(12):3263-70.
89. **Seshadri R., Paulsen I.T., Eisen J.A. et al.** 2003. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(9):5455-60.
90. **Spelman D.W.** 1982. Q fever: a study of 111 consecutive cases. *Med. J. Aust*. 1(13):547-8, 551, 553.
91. **Stein A., and Raoult D.** 1998. Q fever during pregnancy: a public health problem in southern France. *Clin. Infect. Dis*. 27(3):592-6.
92. **Tissot Dupont H., Raoult D., Brouqui P et al.** 1992. Epidemiologic features and clinical presentation of acute Q fever in hospitalized patients – 323 french cases. *Am J Med*. 93:427-34.
93. **Tissot Dupont H., Thirion X. and Raoult D.** 1994. Q fever serology: cutoff determination for microimmunofluorescence. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 1: 189-96.
94. **Tissot Dupont H., Amadei M.A., Nezri M., and Raoult D.** 2004. Wind in November, Q fever in December. *Emerg Infect Dis*. 10(7):1264-69.
95. **Turck W.P., Howitt G., Turnberg L.A., Fox H., Longson M., Matthews M.B., and Das Gupta R.** 1976 . Chronic Q fever. *Q. J. Med*. 45(178):193-217.

96. **Velasco F.P.** 1996. Fiebre Q. Junta de Castilla y Leon, Spain.
97. **Velasco F.P., Porras M.C., Martínez-Bernal M.A. and Jado-García I.** 2007. Fiebre Q tras picadura de garrapatas. *Enferm Infecc Microbiol.* **25** (5): 356-61.
98. **Vishwanath S., and Hackstadt T.** 1988. Lipopolysaccharide Phase variation determines the complemen-mediated serum susceptibility of *Coxiella burnetii*. *Infection and Immunity.* **56** (1): 40-4.
99. **Waldhalm D.G., Stoenner H.G., Simmons R.E. and Thomas L.A.** 1978. Abortion associated with *Coxiella burnetii* infection in dairy goats. *J Am Vet Med Assoc.* **173**(12):1580-1.
100. **Wilson H.G., Neilson G.H., Galea E.G., Stafford G. and O'Brien M.F..** 1976. Q fever endocarditis in Queensland. *Circulation.* **53**(4):680-4.
101. **Woese C.R., Kandler O., and Wheelis M.L.** 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA.* **87**(12): 4576-9.
102. **Yeaman M.R., Roman M.J. and Baca O.G.** 1989. Susceptibility of *Coxiella burnetii* to pefloxacin and ofloxacin in ovo and in persistently infected L929 cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**(5):621-3.