

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



Rastreio serológico de Febre Q em ovinos
no concelho de Montemor-o-Novo

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE PÚBLICA VETERINÁRIA

Ana Catarina Batista Fernandes

Constituição do júri:

Presidente:

Doutora Ana Cristina Gaspar Nunes Lobo Vilela

Vogais:

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

Doutora Yolanda Maria Vaz

Doutora Maria Manuela Clemente Vilhena

Orientadora:

Doutora Ana Cristina Gaspar Nunes Lobo Vilela

2008

Lisboa

NOME: Ana Catarina Batista Fernandes
DEPARTAMENTO: Sanidade Animal
MESTRADO EM: Saúde Pública Veterinária
ORIENTADOR: Doutora Ana Cristina Gaspar Nunes Lobo Vilela
DATA: 31 de Julho de 2008
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Rastreio serológico de Febre Q em ovinos no
concelho Montemor-o-Novo

**Rastreio serológico de Febre Q em ovinos
no concelho de Montemor-o-Novo**

RESUMO

Foi realizado um rastreio para determinar a seroprevalência do agente da Febre Q, *Coxiella burnetii*, nos rebanhos de ovinos do concelho de Montemor-o-Novo, de forma a: i) calcular prevalência de explorações positivas; ii) a prevalência animal por exploração.

Foi seleccionada uma amostra aleatória de 35 explorações, num total de 726 animais, aos quais foram recolhidas amostras de sangue para serem analisadas através de um teste de ELISA comercial para detecção de anticorpos anti *C. burnetii* em fase I e fase II. Foram identificadas 20 explorações (57,1%) com pelo menos um animal positivo. A prevalência intra-exploração variou entre 3% e 50%.

Os estudos epidemiológicos e a investigação sobre surtos ocorridos nos últimos anos em vários países da Europa mostram que a Febre Q deve ser considerada um problema de saúde pública crescente, sendo os ruminantes identificados como a principal fonte de infecção para o Homem.

O conhecimento desta zoonose através de estudos seroepidemiológicos é um passo inicial importante para o seu controlo em Portugal, uma vez que a existência de casos humanos indica a presença do agente no nosso País, mas são escassos os dados relativos à sua ocorrência em espécies animais.

Palavras-chave: *Coxiella burnetii*, Febre Q, zoonose, ovinos, rastreio serológico, Montemor-o-Novo

Serological survey of Q fever in sheep in the Montemor-o-Novo district

ABSTRACT

A survey on seroprevalence of Q fever agent, *Coxiella burnetii*, in sheep flocks in the Montemor-o-Novo district was performed in order to: i) estimate the prevalence of positive flocks; ii) the animal prevalence within the flock .

Thirty-five flocks were randomly selected, comprising a total of 726 sheep. Blood samples were collected to be tested by an ELISA commercial kit for the detection of phase I and phase II anti-*C. burnetii* antibodies. Twenty flocks (57.1%) were identified with at least one positive animal. The prevalence within the flocks ranged between 3% and 50%.

The epidemiological surveys and the investigation of outbreaks that occurred in the last years in several European countries show that Q fever must be considered an increasing public health concern, being the ruminants identified as the main source of infection for Man.

The study of this zoonosis through seroepidemiological survey is an important step for its control in Portugal because, although human cases indicate that the agent is present in the country, data on animal disease are scarce.

Key-words: *Coxiella burnetii*, Q fever, zoonosis, sheep, serological survey, Montemor-o-Novo

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof. Doutora Cristina Vilela, por ter acreditado desde o início, pelo incentivo, energia, determinação e experiência.

À CEVA Santé Animale pela cedência dos testes ELISA, em particular ao Dr. Georges Orszag, Dr. Christophe Manteca e Dr. Jerome Thevenon, sem cujo apoio este trabalho não teria sido possível. Também ao Dr. Philippe Hivorel e aos colegas da Ceva Portugal pelo empenho, companheirismo e estímulo que me ofereceram durante esta etapa.

À Dra. Isabel Mariano e a toda a equipa do Laboratório de Análises da COPRAPEC pela preciosa colaboração na recolha das amostras e de dados.

À Doutora Solange Gil pela ajuda na montagem da técnica ELISA.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa: Manuela, Ricardo, e, em particular, à Carla pela disponibilidade que sempre demonstrou para me ajudar na elaboração das análises laboratoriais.

Aos meus colegas e amigos que mais de perto me acompanharam, em especial o André Magalhães (pelo alento e pelos bons conselhos, como sempre), a Carla Gomes pela revisão e ensinamentos e a Raquel Portugal pela companhia. À Lina Cavaco pela recolha bibliográfica que me cedeu. A todos os amigos, colegas e família, cujo espaço não chega para agradecer, por tudo!

Ao Pedro, à Sofia e à minha mãe, por estarem sempre presentes e pela eterna paciência... foi duro mas valeu a pena.

TRABALHOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS NO ÂMBITO DA DISSERTAÇÃO

FERNANDES C., Vilela C.L., 2007. Rastreamento seroepidemiológico da Febre Q em ovinos nos concelhos de Évora e Montemor-o-Novo. Resumo das Jornadas do Ensino Pós-Graduado da FMV / Simpósio do CIISA, Lisboa.

FERNANDES C., Vilela C.L., 2008. Rastreamento serológico da Febre Q em ovinos no concelho de Montemor-o-Novo. Resumo das XII Jornadas da Associação Portuguesa de Buiatria. Vilamoura.

ÍNDICE GERAL

	Página
I. Introdução	1
I.1 Caracterização do agente etiológico	2
I.1.1. Identificação do agente etiológico	2
I.1.2. Variações antigénicas	3
I.1.3. Ciclo de vida intracelular	3
I.1.4. Modulação da resposta imunitária	8
I.1.4.1. Mecanismos de eliminação da bactéria	9
I.1.4.2. Mecanismos de sobrevivência da bactéria	10
I.1.5. Patogenia	10
I.2 Doença animal	12
I.2.1. Sinais clínicos nos ruminantes domésticos	12
I.2.2. Transmissão da infecção entre rebanhos	13
I.3 Doença humana	14
I.3.1. Febre Q aguda	14
I.3.2. Febre Q crónica	15
I.4 Meios de diagnóstico em medicina veterinária	16
I.4.1. Técnicas serológicas	16
I.4.2. Evidenciação bacteriana	17
I.5 Epidemiologia	20
I.5.1. Vias de exposição	20
I.5.1.1. Via aérea	20
I.5.1.2. Contacto directo com mamíferos e em particular com ovinos	21
I.5.1.3. Contacto com outros mamíferos	22
I.5.1.4. Exposição alimentar	22
I.5.1.5. Fauna selvagem	23
I.5.2. Vias de emissão	24
I.5.2.1. Ruminantes domésticos	24
I.5.2.2. Animais de companhia	27
I.5.2.3. Aves	28
I.5.2.4. Outros vertebrados	28
I.5.2.5. Artrópodes	28
I.5.3. Ambiente	29
I.5.4. Produtos alimentares de origem animal	29

I.5.5. Prevalência da Febre Q nos animais.....	31
I.6 Medidas de biossegurança.....	33
I.6.1. profilaxia sanitária.....	33
I.6.1.1. Medidas de higiene gerais.....	33
I.6.1.2. Desinfectantes.....	33
I.6.2. Meios de profilaxia médica.....	33
I.6.2.1. Antibióticos.....	33
I.6.2.2. Vacinas para animais.....	34
II. Rastreio serológico.....	37
II.1 Introdução.....	38
II.2 Objectivos.....	38
II.3 Material e métodos.....	39
II.3.1. Estudo epidemiológico.....	39
II.3.1.1. Selecção e caracterização das áreas de estudo.....	39
II.3.1.2. Caracterização da população da área em estudo: número de explorações, número de animais, e suas localizações geográficas.....	39
II.3.1.3. Populações animais estudadas e amostragem.....	40
II.3.1.4. Preparação e recolha de amostras.....	42
II.3.1.5. Recolha de dados relativos às explorações.....	42
II.3.2. Técnica Laboratorial.....	43
II.3.2.1. Princípios e descrição da técnica.....	43
II.3.2.2. Especificidade e sensibilidade do teste.....	43
II.3.2.3. Processamento de amostras – protocolo experimental.....	44
II.3.2.4. Cálculo dos resultados.....	45
II.3.3. Análise estatística.....	46
II.3.3.1. Estimativa da proporção de explorações com serologia positiva.....	47
II.3.3.2. Explorações fortemente positivas.....	47
II.3.3.3. Estimativa de seroprevalências intra-exploração nas explorações positivas.....	47
II.3.3.4. Estatística analítica.....	48
II.4 Resultados.....	49
II.4.1. Caracterização das explorações.....	49
II.4.2. Rastreio seroepidemiológico – detecção de doença.....	51
II.4.2.1. Distribuição por freguesia.....	51
II.4.2.2. Distribuição por tamanho da exploração.....	53
II.4.2.3. Distribuição por mês de colheita das amostras de sangue.....	55

II.4.2.4. Explorações fortemente positivas.....	56
II.4.3. Estudo descritivo – estimativa de doença.....	59
II.4.3.1. Caracterização da distribuição de seroprevalências intra-exploração	60
II.5 Discussão.....	66
III. Impacto na saúde pública.....	75
III.1 Objectivos	76
III.2 Metodologia	76
III.3 Resultados	77
III.3.1. Portugal.....	77
III.3.2. Outros países	79
III.4 Discussão	82
IV. Conclusão.....	86
V. Bibliografia	90

ÍNDICE DE TABELAS, FIGURAS E GRÁFICOS

Tabelas

Tabela 1: Tipos de células que podem ser infectadas por <i>C. burnetii</i>	4
Tabela 2: Número de casos em animais em Portugal, declarados à DGV, entre 1998 e 2002	31
Tabela 3: Número de casos em animais em Portugal, declarados à OIE, entre 1996 e 2004 ..	31
Tabela 4: Seroprevalência da Febre Q em animais obtida nos principais rastreios mais recentes em todo o mundo.	32
Tabela 5: Explorações abrangidas pela OPP de Montemor-o-Novo.	40
Tabela 6: CHEKIT Q Fever ELISA e Teste da Fixação do Complemento: comparação.....	44
Tabela 7: Tamanho do efectivo das explorações pertencentes à amostra.....	50
Tabela 8: Distribuição das explorações pertencentes à amostra – freguesia	50
Tabela 9: Distribuição das explorações da amostra em função do seu tamanho e da freguesia	50
Tabela 10: Classificação das explorações de acordo com os resultados de ELISA.....	51
Tabela 11: Distribuição das explorações por freguesia.....	53
Tabela 12: Distribuição das explorações em função do tamanho da exploração.....	54
Tabela 13: Explorações com apenas um soro positivo	55
Tabela 14: Distribuição das explorações da amostra em função da data de recolha das amostras de sangue.....	55
Tabela 15: Reclassificação das explorações	56

Tabela 16: Distribuição das explorações positivas em função da freguesia	57
Tabela 17: Distribuição das explorações positivas em função do tamanho da exploração	57
Tabela 18: Distribuição das explorações positivas em função do mês de recolha.....	57
Tabela 19: Seropositividade nas explorações positivas	60
Tabela 20: Seroprevalências por exploração – análise estatística descritiva	62
Tabela 21: Casos de Febre Q em Humanos em Portugal reportados à DGS, por região.....	78
Tabela 22: Casos de Febre Q em Humanos em Portugal reportados à DGS, por grupo etário.	78
Tabela 23: Seroprevalência de Febre Q em Humanos obtida nos principais surtos ocorridos entre 1995 2003.....	79
Tabela 24: Principais surtos de Febre Q publicados desde 1999	80
Tabela 25: Resultados de meta-análise, em % de seropositividade para <i>C. burnetii</i> em diferentes espécies e países	81

Figuras

Figura 1: <i>C. burnetii</i>	2
Figura 2: Vacúolos parasitóforos com <i>C. burnetii</i>	6
Figura 3: Vacúolo parasitóforo contendo formas em desenvolvimento de <i>C. burnetii</i> (microfotografia por transmissão de electrões).....	6
Figura 4: Biogénese do vacúolo parasitóforo de <i>C. burnetii</i>	7
Figura 5: Granulomas, revelados por análise histoquímica de fígado (A) e rim (B) de ratos, após infecção com <i>C. burnetii</i>	8
Figura 6: Região abrangida pela OPP de Montemor-o-Novo	39
Figura 7: Mapa do concelho de Montemor-o-Novo	40
Figura 8: Aspecto de uma placa do teste ELISA CHEKIT-Q-Fever	45
Figura 9: Distribuição das explorações testadas por freguesia	52

Gráficos

Gráfico 1: Tamanho do efectivo das explorações pertencentes à amostra	49
Gráfico 2: Proporção de explorações positivas e negativas na amostra de acordo com os resultados de ELISA aplicado aos soros individuais	51
Gráfico 3: Proporção de explorações positivas e negativas na amostra em cada freguesia.....	53
Gráfico 4: Distribuição das explorações da amostra em função do seu tamanho	54
Gráfico 5: Distribuição das explorações em função da data de recolha das amostras de sangue	56

Gráfico 6: Distribuição das explorações positivas por mês de recolha das amostras	58
Gráfico 7: Distribuição das explorações positivas por mês de recolha das amostras	58
Gráfico 8: Estimativa das seroprevalências por exploração	59
Gráfico 9: Seroprevalências por exploração – distribuição de frequências	61
Gráfico 10: Seroprevalências por exploração – análise estatística descritiva.....	61
Gráfico 11: Seroprevalências por exploração – análise estatística descritiva agrupada em função do tamanho de exploração.....	62
Gráfico 12: Seroprevalências por exploração – análise estatística descritiva agrupada em função do mês de colheita das amostras	63
Gráfico 13: Estimativa das seroprevalências por exploração positiva e fortemente positiva ..	63
Gráfico 14: Seroprevalências por exploração – análise estatística descritiva agrupada em função do grau de seropositividade.....	64
Gráfico 15: Estimativa das seroprevalências por exploração positiva e fortemente positiva ..	64
Gráfico 16: Estimativa da proporção de soros positivos e fortemente positivos em cada exploração	65

ABREVIATURAS UTILIZADAS

LPS	Lipopolissacárido
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked- Immunosorbent Assay</i>
OIE	<i>Office Internationale des Epizooties</i>
DGV	Direcção Geral de Veterinária
DGS	Direcção Geral de Saúde
OPP	Organização de Produtores Pecuários
AFSSA	<i>Agence Française de Sécurité et Santé Animale</i>
COPRAPEC	Cooperativa Agrícola de Compra e Venda de Montemor-o-Novo
SCV	<i>Small Cell Variant</i>
LCV	<i>Large Cell Variant</i>
VP	Vacúolo Parasitóforo
INF	Interferão
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
IFA	Imunofluorescência indirecta
FC	Fixação do Complemento
INRA	<i>Institute Nacional de Recherche Agricole</i>

SÍMBOLOS UTILIZADOS

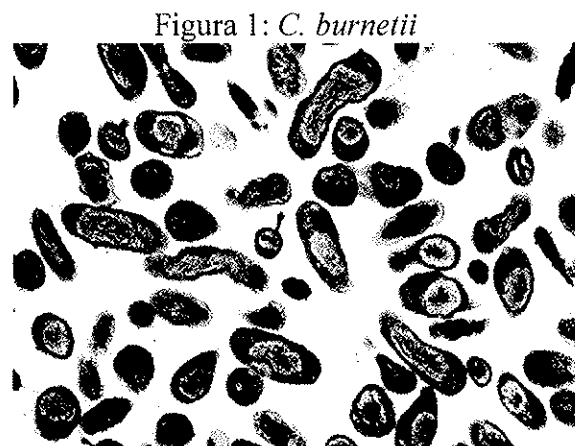
%	percentagem
° C	grau Celsius
g	grama
km	quilómetro
m	metro
µm	micrómetros
nm	nanómetro

I. INTRODUÇÃO

I.1 CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE ETIOLÓGICO

I.1.1. IDENTIFICAÇÃO DO AGENTE ETIOLÓGICO

A Febre Q é uma zoonose ubiqüitária provocada por *Coxiella burnetii* (Figura 1), um cocobacilo Gram negativo, pleomórfico de pequenas dimensões (0,2 a 0,4 µm de diâmetro e 0,4 a 1 µm de comprimento), intracelular obrigatório e que se replica dentro do fagolisossoma das células eucarióticas fagocíticas (Hackstadt e Williams, 1981; Fournier *et al.*, 1998; Maurin e Raoult, 1999; Zamboni *et al.*, 2002).



Fonte: http://pathport.vbi.vt.edu/pathinfo/pathogens/Coxiella_burnetii.html

C. burnetii foi originalmente classificada como *Rickettsia burneti*, devido às suas relações com as células do hospedeiro, às características patogênicas e ecológicas: tal como as *Rickettsiae*, é um organismo intracelular obrigatório e tem como reservatório as carraças (Parker *et al.*, 2006; Cutler *et al.*, 2007). Actualmente, a classificação baseia-se nas características microbianas específicas, como a composição dos lipopolissacarídeos da parede (LPS), e vias metabólicas, bem como nas características genéticas, nomeadamente na composição da sequência 16S do RNA (Weisburg *et al.*, 1989; Stein *et al.*, 1993; Fournier *et al.*, 1998; Maurin e Raoult, 1999; Seshadri *et al.*, 2003), o que permitiu identificar uma homologia marcada com *Legionella pneumophila* (Vogel, 2004).

O genoma completo da estirpe Nine Mile de *C. burnetii* foi sequenciado em 2003 (Seshadri *et al.*, 2003). A análise da sequência genética permitiu classificar o género *Coxiella* na ordem *Legionellales*, família *Coxiellaceae* (Seshadri *et al.*, 2003), no grupo gama das *Proteobacteria* (Weisburg *et al.*, 1989; Stein *et al.*, 1993).

A análise genética de diferentes estirpes de *C. burnetii*, com origens geográficas distintas,

revelou a homogeneidade filogenética do género *Coxiella*, tendo *C. burnetii* como única espécie (Stein *et al.*, 1993; Parker *et al.*, 2006; Cutler *et al.*, 2007). No entanto, têm sido detectados novos organismos semelhantes a *Coxiella*, tal como *Rickettsiella grylli*, um microorganismo intracelular patogénico encontrado em gafanhotos (Seshadri e Samuel, 2005), um outro, ainda não classificado, encontrado em carraças recolhidas de pelicanos (Reeves *et al.*, 2005) e outro no camarão (Cooper *et al.*, 2007). Com base nestas descobertas, é possível que as relações filogenéticas deste grupo sejam re-equacionadas nos próximos anos (Cutler *et al.*, 2007).

I.1.2. VARIACÕES ANTIGÉNICAS

C. burnetii exhibe uma variação antigénica que tem sido associada à virulência da bactéria. Quando sujeita a cultura em ovos, a fase I passa a fase II, considerada menos virulenta (Maurin e Raoult, 1999).

As bactérias na fase II, *in vivo*, são sensíveis à acção do complemento e são rapidamente eliminadas pelos macrófagos, enquanto que as bactérias em fase I sobrevivem à sua acção bactericida (Kishimoto e Walker, 1976).

O papel desta variação de fase no hospedeiro ainda está por determinar, sendo a transição entre as duas fases uma possível estratégia para a *Coxiella* ultrapassar a resposta imunitária do hospedeiro (AFFSA, 2004).

I.1.3. CICLO DE VIDA INTRACELULAR

A multiplicação de *C. burnetii* tem lugar em condições intracelulares (Hackstadt e Williams, 1981; Zamboni *et al.*, 2002).

C. burnetii tem a capacidade de infectar diferentes tipos de células, incluindo monócitos e macrófagos *in vivo* e *in vitro* (Baca e Paretzky, 1983; Voth e Heinzen, 2007) –Tabela 1.

Tabela 1: Tipos de células que podem ser infectadas por *C. burnetii*

Tipo de Célula	Espécie	Autor
Vero – epitélio renal	Macaco	Heinzen <i>et al.</i> , 1996
BHK-21 – fibroblasto renal	Hamster	Miller <i>et al.</i> , 2004
L929 – fibroblasto	Murino	Baca e Paretsky, 1983
HEL – fibroblasto pulmonar	Humano (embrionico)	Raoult <i>et al.</i> , 1990
HeLa – epitélio cervical	Humano	Beron <i>et al.</i> , 2002
CHO – fibroblasto ovárico	Hamster Chinês	Romano <i>et al.</i> , 2007
Macrófagos alveolares do pulmão	Rato	Khavkin e Tabibzadeh, 1988
Células de Kupfer no fígado	Rato	Stein <i>et al.</i> , 2005
Pneumócitos, fibroblastos e células endoteliais	Rato	Khavkin e Tabibzadeh, 1988
J774A.1 – tipo macrófago	Murino	Brennan <i>et al.</i> , 2004
P3881 – tipo macrófago	Murino	Tujulin <i>et al.</i> , 1999
THP-1 – tipo monócito	Humano	Ghigo <i>et al.</i> , 2002
Monócitos	Humano	Ghigo <i>et al.</i> , 2004
Células dendríticas	Humano	Shannon <i>et al.</i> , 2005

Adaptado de Voth e Heinzen, 2007.

Esta capacidade para invadir e subsequentemente se multiplicar nestas células eucarióticas é um importante factor de virulência que permite a propagação de *C. burnetii* em diferentes hospedeiros (Stein *et al.*, 2000; Arricau-Bouvery *et al.*, 2003).

Embora o ciclo de vida completo não esteja totalmente elucidado, sabe-se que *C. burnetii* pode existir sob duas formas morfológicas diferentes (Nermut *et al.*, 1968; Canonico *et al.*, 1972; Wiebe *et al.*, 1972). McCaul e Williams (1981) propuseram a designação de “*Small Cell Variant*” (SCV) e “*Large Cell Variant*” (LCV) para diferenciar as duas formas de *C. burnetii* observadas nas células persistentemente infectadas, facilmente distinguíveis por microscopia electrónica (Heinzen *et al.*, 1999; Samuel *et al.*, 2003).

Enquanto que as LCV se multiplicam nos monócitos ou macrófagos do hospedeiro, as SCV têm sido associadas a uma estrutura semelhante a esporos, com a capacidade de persistir sob condições ambientais extremas tais como o calor, pressão, agentes químicos e são metabolicamente pouco activas. São resistentes no meio exterior, sobrevivendo no ambiente, fora do hospedeiro (Heinzen *et al.*, 1999; Melnicakova *et al.*, 2003; Cutler *et al.*, 2007).

Durante a sua multiplicação, as LCV parecem ser capazes de apresentar um fenómeno próximo ao da esporulação, uma vez que por vezes é possível observar-se a formação de um septo que divide o citoplasma da célula em dois compartimentos de tamanho diferente, cada

um encerrando um material nuclear completo. O compartimento celular mais pequeno daria lugar a uma estrutura semelhante a um endosporo situado numa das extremidades do LCV (McCaul e Williams, 1981; Norlander, 2000). Estes pseudo-esporos foram descritos no interior dos LCV mas também em válvulas cardíacas infectadas por *C. burnetii* (McCaul *et al.*, 1994). As amibas (*Acanthamoeba castellanii*) podem igualmente representar um nicho intracelular para a formação de pseudo-esporos, contribuindo para a sobrevivência de *C. burnetii* no ambiente (La Scola e Raoult, 2001). No entanto, a esporulação não é admitida por todos os autores (AFSSA, 2004).

Os LCV e os SCV são ambos infecciosos (Wiebe *et al.*, 1972), no entanto, a ausência de resistência dos LCV aos choques osmóticos sugere que apenas os SCV possam sobreviver no meio extra-celular e ter um papel relevante na transmissão.

A internalização da bactéria é diferente conforme esta se encontra na fase I ou na fase II (Capo *et al.*, 1999, 2003; Honstetter *et al.*, 2004). A ligação da bactéria em fase I é mediada apenas pela integrina $\alpha\beta3$, enquanto que na fase II é mediada por esta integrina e pelo receptor CR3 do complemento, tornando a internalização desta última mais eficiente, o que justifica que se multiplique mais rapidamente que a fase I (Capo *et al.*, 1999). Estas diferenças de comportamento entre *C. burnetii* fase I e *C. burnetii* fase II permitem justificar o facto de apenas as bactérias em fase I serem infecciosas. *C. burnetii* em fase II, embora penetre mais facilmente na célula, é rapidamente destruída pelo sistema fagolisossomal (Mege *et al.*, 1997; AFSSA, 2004).

Pelo contrário, *C. burnetii* em fase I bloqueia o receptor CR3 e utiliza receptores aparentados às integrinas, o complexo LRI (*leukocyte response integrin*, $\alpha\beta3$) – IAP (*integrin-associated proteins*) (Mege *et al.*, 1997), induzindo a reorganização dos filamentos de actina e da formação de pseudo-esporos, de forma semelhante à *Salmonella*, para penetrar nos macrófagos por indução da fagocitose (Honstetter *et al.*, 2004). Os pseudo-esporos não contêm CR3, mas apresentam $\alpha\beta3$. A bactéria é, por isso, fracamente internalizada pela célula, mas é capaz de aí sobreviver e de se multiplicar (Mege *et al.*, 1997; Capo *et al.*, 2003).

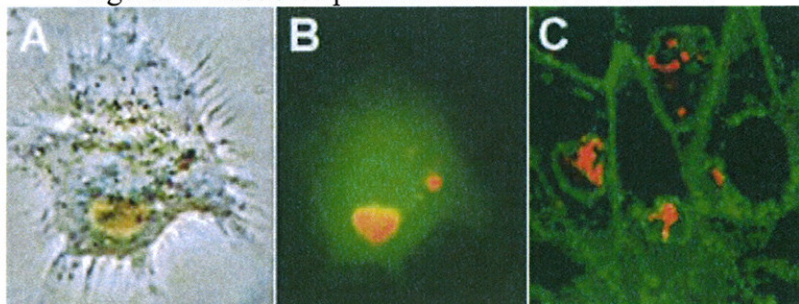
C. burnetii sobrevive e divide-se no ambiente acidificado dos fagolisossomas das células do hospedeiro (Vogel, 2004), apesar da presença de factores tóxicos tais como hidrolases ácidas e defensas (Akporiaye *et al.*, 1983).

Howe e Mallavia (2000) demonstraram que, após a entrada passiva nos fagossomas das

células do hospedeiro, *C. burnetii* viáveis têm a capacidade de retardar a formação do fagolisossoma. Segundo estes autores, o pH óptimo para as actividades metabólicas de *C. burnetii* encontra-se entre 4,5 e 5,5, respectivamente o pH do fagolisossoma e o endossoma, sendo óptimo a 5,5, o que sugere que *C. burnetii* prefere um ambiente ligeiramente menos ácido mais próximo do pH do endossoma.

C. burnetii replica-se dentro de vacúolos parasitóforos (Figura 2), os quais têm características lisossomais (Burton *et al.*, 1971; Heinzen *et al.*, 1996), adaptando-se e tendo o metabolismo activo no ambiente lisossomal (pH \approx 4,5) (Hackstadt e Williams, 1981). É neste ambiente normalmente bactericida que *C. burnetii* se replica, atingindo números elevados dentro do vacúolo parasitóforo em expansão (Figura 3). A lise das células hospedeiras liberta os microorganismos que se disseminam para infectar diferentes tecidos (Maurin e Raoult, 1999).

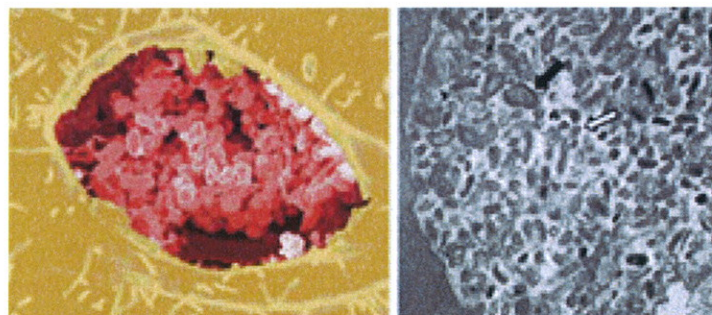
Figura 2: Vacúolos parasitóforos com *C. burnetii*



Fonte: <http://www3.niaid.nih.gov/labs/aboutlabs/licp/coxiellaPathogenesisSection/>

A e B) macrófago contendo um vacúolo parasitóforo de *C. burnetii*; C) *C. burnetii* (em vermelho) está envolta numa membrana de um vacúolo parasitóforo (verde) em células Vero.

Figura 3: Vacúolo parasitóforo contendo formas em desenvolvimento de *C. burnetii* (microfotografia por transmissão de electrões)



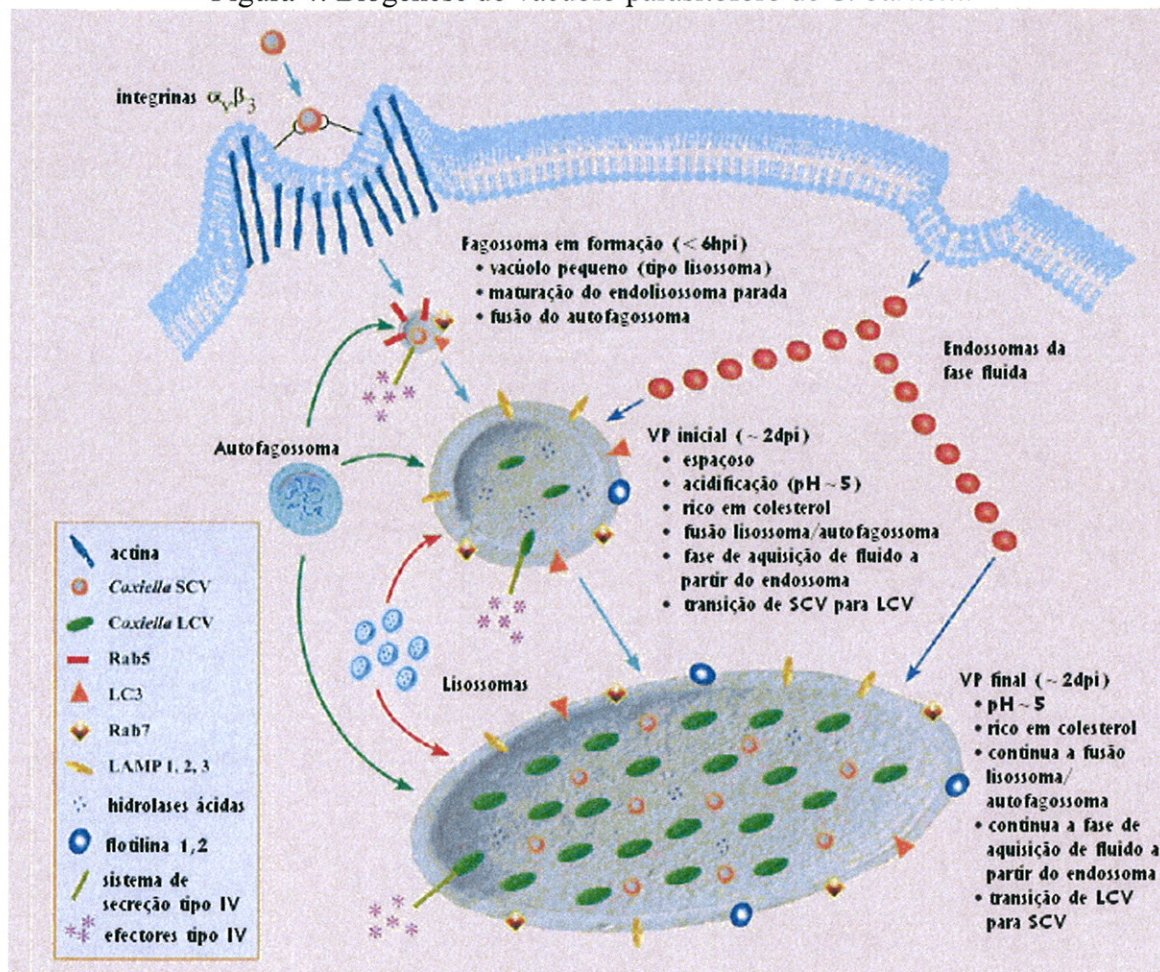
Fonte: <http://www3.niaid.nih.gov/labs/aboutlabs/licp/coxiellaPathogenesisSection/>

Os últimos anos têm sido profícuos em publicações que tentam clarificar os mecanismos intracelulares de *C. burnetii*, o que tem permitido compreender melhor as interações com as células dos hospedeiros e, principalmente, a sua capacidade de sobrevivência nos

lisossomas, um ambiente hostil para a maioria dos microorganismos, onde é metabolicamente activa e se diferencia morfologicamente (Voth e Heinzen, 2007). Estas descobertas recentes vêm permitir criar modelos para explicar as interações hospedeiro-parasita, de forma a compreender melhor os factores de virulência expressos pela bactéria para provocar doença nos animais e no Homem.

A Figura 4 apresenta um modelo proposto por Voth e Heinzen (2007) para explicar a biogénese do vacúolo parasitóforo que aloja *C. burnetii* dentro das células do hospedeiro.

Figura 4: Biogénese do vacúolo parasitóforo de *C. burnetii*.



(Adaptado de Voth e Heinzen, 2007)

A SCV em fase I (estável no ambiente) liga-se, através de uma adesina desconhecida, à integrina $\alpha v \beta 3$ da superfície do macrófago. Ao mesmo tempo dá-se a fosforilação da tirosina das proteínas do hospedeiro que permite localizar os filamentos de actina nas protusões da membrana, mediando a internalização de *C. burnetii*. A maturação do fagossoma recém-formado, através da via endolisossomal, para adquirir os marcadores lisossomais, é inicialmente paralísada durante aproximadamente 2 horas pós infecção (hpi), período durante o qual o vacúolo adquire o marcador LC3 autofágico. Este fagossoma recém-criado é também enriquecido para a GTPase pequena Rab5 com menor recrutamento de Rab7. A paralísada do fagossoma e a interacção com as vesículas autofágicas estão dependentes da síntese de proteínas por *C. burnetii*, potencialmente manifestadas pela secreção de moléculas efectoras tipo IV. 1-2 dias pós infecção (dpi), o vacúolo parasitóforo (VP) recém-formado, alarga drasticamente, tornando-se num vacúolo espaçoso que abriga um pequeno número de organismos. O vacúolo tem um ambiente ácido (\sim pH 5), retém LC3 e Rab7 e adquire os marcadores lisossomais LAMP 1,2 e 3, bem como várias hidrolases ácidas. A membrana do VP

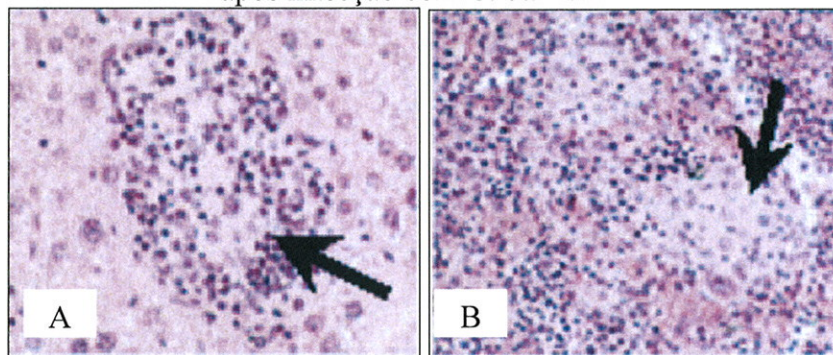
recém-formado é rica em colesterol e contém as proteínas flotilina 1 e 2 da jangada lipídica. Ao mesmo tempo, as SCV sofrem diferenciação para LCV que se divide por cissiparidade. A interação continuada entre o VP recém-formado e as vias metabólicas endocíticas é evidenciada pela aquisição de marcadores da fase fluida para o lúmen do VP. O VP final (~6 dpi) é semelhante ao inicial pois mantém interações com as vias metabólicas autofágicas e endolisossomais. Porém, nesta fase, o vacúolo está fortemente carregado com a bactéria que está no período de transição de LCV para SCV, produzindo um contínuo de formas morfológicas de *C. burnetii*. É necessário que ocorra síntese proteica contínua (efectores tipo IV) para manter a arquitectura espaçosa quer do VP recém-formado quer do final. (Este modelo é baseado na organização dos dados obtidos em vários estudos que utilizam diferentes sistemas de células de hospedeiro.)

I.1.4. MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNITÁRIA

A Febre Q induz uma resposta imunitária sistémica no hospedeiro infectado, com uma marcada componente proliferativa e produção de INF- γ , e que se manifesta pela formação de granuloma (Koster *et al.*, 1985; Izzo *et al.*, 1988; Izzo e Marmion, 1993; Mege *et al.*, 1997). Contudo, esta resposta imunitária não erradica *C. burnetii*, podendo ocorrer recidivas (Maurin e Raoult, 1999; Harris *et al.*, 2000).

Em ratos, os granulomas, detectados nos lobos do fígado, espaços portobiliares e no baço, são principalmente compostos por macrófagos, linfócitos e alguns leucócitos polimorfonucleares (Figura 5) (Honstetter *et al.*, 2006).

Figura 5: Granulomas, revelados por análise histoquímica de fígado (A) e rim (B) de ratos, após infecção com *C. burnetii*



Fonte: Honstetter *et al.*, 2006

A resposta imunitária inata não é suficiente para proteger o hospedeiro contra a infecção por *C. burnetii* (Honstetter *et al.*, 2004). O desenvolvimento de uma resposta imunitária protectora contra os microorganismos intracelulares, incluindo *C. burnetii*, requer uma resposta imunitária adaptativa.

Os resultados de vários modelos animais de infecção com *C. burnetii* e de pacientes com Febre Q demonstraram que a imunidade adaptativa mediada por linfócitos T desempenha um papel preponderante na protecção contra a infecção (Koster *et al.*, 1985; Izzo e

Marmion, 1993; Mege *et al.*, 1997; Andoh *et al.*, 2003; Honstetter *et al.*, 2003).

A forma aguda da Febre Q induz, aparentemente, uma resposta imunitária eficiente que pode eventualmente limitar a replicação da bactéria, mas é incapaz, em muitos casos, de a eliminar completamente. Um estudo de Marmion *et al.* (2005) detectou *C. burnetii* na medula óssea de 88% dos pacientes 12 anos após terem sofrido de Febre Q aguda. Em animais foram também reportadas infecções persistentes assintomáticas (Harris *et al.*, 2000). Foram recolhidas *C. burnetii* viáveis a partir de tecidos animais até 500 dias após a infecção e, em cobaias, pode ser reactivada na gestação, por irradiação ou tratamento com corticóides (Sidwell *et al.*, 1964a, 1964b, 1966).

Na Febre Q crónica, a imunidade mediada por células é deficiente, estando associada à ausência de granulomas, à diminuição da linfoproliferação induzida por antigénios, bem como a disfunção na rede de citoquinas (Capo *et al.*, 1996; Ghigo *et al.*, 2001; Honstetter *et al.*, 2003).

I.1.4.1. Mecanismos de eliminação da bactéria

O controlo da infecção é mediado por macrófagos e monócitos que são activados pelo interferão gama (IFN- γ), levando à libertação de radicais intermediários de oxigénio e nitrogénio (Brennan *et al.*, 2004), conduzindo à morte intracelular do parasita (Waag, 2007). Efectivamente, diversos estudos *in vitro* demonstraram que a activação pelo IFN- γ de monócitos de cobaias (THP-1) (Dellacasagrande *et al.*, 1999), de fibroblastos de murino (L929) (Turco *et al.*, 1984; Howe *et al.*, 2002) e de macrófagos primários de rato (Zamboni e Rabinovitch, 2003) resulta na inibição da replicação de *C. burnetii*.

Monócitos THP-1 estimulados com IFN- γ conseguem, não só inibir a replicação de *C. burnetii*, mas também promover a morte dos monócitos que alojam a bactéria, através de um mecanismo de apoptose mediado em parte pelo TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*) (Dellacasagrande *et al.*, 1999).

O envolvimento de citoquinas no controlo da infecção de monócitos/macrófagos humanos por *C. burnetii* tem sido examinado nos últimos anos para tentar explicar os efeitos antimicrobicidas que permitem o desenvolvimento de infecções crónicas em humanos (Capo *et al.*, 1999; Dellacasagrande *et al.*, 1999; Ghigo *et al.*, 2001; Waag, 2007). A desregulação da rede de citoquinas, resultando na diminuição das respostas bactericidas, pode permitir a persistência nos casos crónicos (Cutler, 2007).

I.1.4.2. Mecanismos de sobrevivência da bactéria

C. burnetii usa a evasão e a supressão da resposta imunitária do hospedeiro para sobreviver, logo, uma das estratégias de sobrevivência será evitando a activação de células hospedeiras, o que lhe permite persistir nas mesmas (Waag, 2007).

A capacidade de *C. burnetii* diminuir a resposta imunitária foi documentada em modelos murinos para Febre Q (Waag, 2007). A injeção intraperitoneal de ratos com *C. burnetii* em fase I, associada a Febre Q aguda, suprimiu a resposta linfoproliferativa das células do baço (Damrow *et al.*, 1985).

A regulação do monóxido de azoto poderá também desempenhar um papel na manutenção das infecções latentes, uma vez que *in vitro*, *C. burnetii* reside num estado quiescente de não replicação quando sujeita a stress provocado por monóxido de azoto e que a replicação é retomada quando este é removido, podendo passar-se o mesmo *in vivo* (Howe *et al.*, 2002; Waag, 2007).

As infecções agudas estão associadas com uma resposta inflamatória protectora, indicada pela presença de granuloma (Pentilla *et al.*, 1998). A Febre Q crónica resulta de uma resposta ineficaz a *C. burnetii*, sem a formação de granuloma e pela ausência de produção de linfoproliferação e produção de IFN- γ , bem como em presença de anticorpos (Izzo e Marmion, 1993; Raoult e Marie, 1995).

Recentemente, dois trabalhos (Lührmann e Roy, 2007; Voth *et al.*, 2007) sugeriram que *C. burnetii* inibe a apoptose das células hospedeiras, providenciando, assim, um nicho onde pode completar o seu ciclo infeccioso.

I.1.5. PATOGENIA

Com base em estudos com modelos animais, sabe-se que, após a infecção inicial, no local de entrada (geralmente os pulmões), o microorganismo é fagocitado pelos macrófagos residentes e transportado a nível sistémico, provocando alterações histológicas nos pulmões, fígado e baço (La Scola *et al.*, 1997; Andoh *et al.*, 2003; Russell-Lodrigue *et al.*, 2006). Após a fagocitose, *C. burnetii* multiplica-se nos fagolisossomas (Hackstadt e Williams, 1981). Esta proliferação levará à ruptura da célula hospedeira e à infecção de outras células. Nos modelos animais, o baço, o fígado e outros tecidos do sistema reticuloendotelial parecem ser os mais infectados (Khavkin, 1977). A via de infecção e a dose do inóculo são factores que determinam a manifestação clínica da doença (La Scola *et al.*, 1997). Os sinais

clínicos em cobaios infectados experimentalmente através de aerossol incluíram febre, perda de peso, dificuldades respiratórias e mortes, em graus e duração variáveis conforme a dose de inóculo aplicada (Russell-Lodrigue *et al.*, 2006). A inoculação de apenas 10 *C. burnetii* em fase I em cobaios resulta numa infecção auto-limitante, com febre alta (Moos and Hackstadt, 1987; La Scola *et al.*, 1997; Russell-Lodrigue *et al.*, 2006). Contudo, são necessárias doses mais elevadas ($>1 \times 10^5$ organismos) para que estirpes de ratinhos, resistentes (ex.: C57BL/6) ou sensíveis (ex.: A/J) a *C. burnetii*, mostrem sinais clínicos de infecção tais como esplenomegália (Brennan *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004).

Após a infecção com *C. burnetii* em caprinos que abortaram, foram encontradas lesões na glândula mamária, no pulmão e no fígado. Os trofoblastos da membrana corioalantóica foram as principais células-alvo na placenta (Sánchez *et al.*, 2006).

I.2 DOENÇA ANIMAL

I.2.1. SINAIS CLÍNICOS NOS RUMINANTES DOMÉSTICOS

A infecção por *C. burnetii* é geralmente assintomática nos animais, embora nos mamíferos provoque abortos em fim de gestação, partos prematuros ou o nascimento de animais fracos ou nados mortos (Waldham *et al.*, 1978; Palmer *et al.*, 1983).

Os ruminantes em gestação são altamente susceptíveis à infecção e os abortos ocorrem preferencialmente na primeira gestação após a infecção. As gestações seguintes terminam normalmente sem distúrbios reprodutivos (AFSSA, 2004).

Estudos experimentais realizados na década de 1950 (Babudieri, 1959) indicaram que os abortos por Febre Q em ruminantes eram mais comuns em cabras e ovelhas do que em vacas. Raramente se observam elevadas taxas de aborto, excepto em algumas explorações de caprinos (Palmer *et al.*, 1983).

A análise da seroprevalência de *C. burnetii* em 9349 soros de ovinos e caprinos, na Sardenha, entre 1999 e 2002, indicou que, embora a distribuição de *C. burnetii* seja elevada nestas espécies (47% de explorações de ovinos e 38% de caprinos com serologia positiva), os resultados da análise de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) de 517 amostras de abortos ocorridas nos mesmos efectivos demonstram que 10% de fetos ovinos abortados e 6% de caprinos eram positivos à análise de PCR para *C. burnetii* (Masala *et al.*, 2004). Em Espanha, num estudo realizado em 148 explorações com abortos em ovinos, 9% eram devidos a *C. burnetii*, conforme análise de PCR (Oporto *et al.*, 2006).

Em caprinos infectados experimentalmente, após inoculação de *C. burnetii*, 100% dos animais abortaram no último terço da gestação (Arricau-Bouvery *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2006), acompanhados de multiplicação bacteriana massiva na placenta nas semanas que precederam o aborto.

A infecção nos bovinos pode ser responsável por metrites (Tainturier, 1987), abortos, bezerros com baixo peso à nascença, infertilidade, bem como pelo desenvolvimento de pneumonias (Ho *et al.*, 1995; Plommet *et al.*, 1973; Wittenbrink *et al.*, 1994). Embora *C. burnetii* tenha sido associada a abortos (Cabassi *et al.*, 2006), é considerada uma causa esporádica nesta espécie, onde a presença da bactéria está ligada sobretudo à ocorrência de placentite (Bildfell *et al.*, 2000). A metrite pode ser, com frequência, a única manifestação

da doença, sendo a infecção endémica em vacas leiteiras responsável por redução da fertilidade (To *et al.*, 1998). Embora nos ruminantes a via respiratória seja a principal via de penetração de *C. burnetii*, apenas raramente são descritas infecções pulmonares ou cardíacas (AFSSA, 2004).

I.2.2. TRANSMISSÃO DA INFECÇÃO ENTRE REBANHOS

A difusão aérea de *C. burnetii* durante o aborto ou o parto é um dos principais factores de infecção dos animais e da transmissão da infecção entre rebanhos, podendo esta infecção ser continuada ao longo do tempo, devido ao facto de *C. burnetii* ser resistente ao calor e à dessecação (Welsh *et al.*, 1957). Uma placenta infectada abandonada num prado, no estrume ou nos excrementos espalhados num campo, pode infectar os rebanhos a vários quilómetros de distância.

A transmissão por carraças é igualmente possível. A infecção por ingestão de placenta contaminada por *C. burnetii* foi estudada (AFSSA, 2004), mas esta não é considerada como uma via importante (Durand, 1993).

I.3 DOENÇA HUMANA

A infecção por *C. burnetii* no Homem é, na maioria das vezes, assintomática, ou manifesta-se de forma pouco evidente, semelhante a uma síndrome gripal, com recuperação espontânea. Porém, a Febre Q pode ter complicações sérias na forma aguda, como pneumonia, hepatite, meningoencefalite ou miocardite, e nos casos em que assume a forma crónica, através de endocardite, podendo vir a ser fatal na ausência de tratamento. Os indivíduos em maior risco são aqueles com processos valvulares precedentes, os imunocomprometidos e as mulheres grávidas, em que ocorrem abortos, partos prematuros e recém-nascidos com pouco peso. O quadro clínico da Febre Q em humanos pode, assim, assumir formas muito diferenciadas, o que dificulta o seu diagnóstico, contribuindo para a sub-notificação da doença (Fournier *et al.*, 1998; Maurin e Raoult, 1999; Raoult *et al.*, 2000).

I.3.1. FEBRE Q AGUDA

Os sinais clínicos são frequentemente sub clínicos ou extremamente ligeiros, sendo cerca de 60% dos casos de Febre Q assintomáticos (Maurin e Raoult, 1999).

O período de incubação é de aproximadamente 20 dias, podendo variar entre 10 e 40 dias. Os sinais clínicos variam muito de paciente para paciente.

Estão descritas 3 formas de apresentação mais típicas (Fournier *et al.*, 1998):

- 1) Síndrome gripal, com febre elevada, fadiga, cefaleias e mialgias;
- 2) Pneumonia atípica, com tosse não produtiva, febre e poucas anomalias à auscultação. A duração dos sintomas varia de 10 a 90 dias, e a mortalidade varia de 0,5 a 1,5%;
- 3) Hepatite clinicamente assintomática, hepatite com hepatomegália e icterícia, e febre prolongada de origem desconhecida com granulomas em biópsia hepática;

Podem também ocorrer outras manifestações atípicas, tais como pericardite e/ou miocardite que é frequentemente fatal se não for tratada, meningite asséptica, anemia hemolítica, tiroidite, gastroenterite, pancreatite, entre outras.

I.3.2. FEBRE Q CRÓNICA

Ocorre em aproximadamente 5% dos pacientes infectados com *C. burnetii* e pode desenvolver-se insidiosamente meses a anos após doença aguda. O coração é o órgão mais frequentemente envolvido, seguido das artérias, ossos e fígado (Fournier *et al.*, 1998). A endocardite ocorre com frequência em pacientes com doença valvular prévia ou naqueles que estão imunocomprometidos. Devido à sintomatologia não ser específica e ao diagnóstico não ser evidente, as taxas de mortalidade podem atingir valores elevados, como 65% em doentes com a forma crónica da doença (Euzéby, 2001; CDC, 2007). Outras manifestações de doença crónica são o desenvolvimento de aneurismas, fibrose e cirrose hepática, osteoartrite e osteomielite, entre outros (Fournier *et al.*, 1998).

I.4 MEIOS DE DIAGNÓSTICO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Estão disponíveis vários métodos para o diagnóstico directo e indirecto da Febre Q, sendo mais frequente o recurso a técnicas serológicas. A OIE (2003) refere diferentes tipos de testes, nomeadamente: imunofluorescência indirecta (IFA), ELISA e fixação do complemento (FC). A técnica de ELISA tende a substituir a IFA e a FC por permitir a realização de rastreios de larga escala e a detecção de anticorpos anti *C. burnetii* em diferentes espécies animais (OIE, 2004; AFSSA, 2004). Estão actualmente disponíveis no mercado vários testes comerciais baseados nestas técnicas, prontos a usar.

I.4.1. TÉCNICAS SEROLÓGICAS

FC e ELISA

Em serologia, a fixação do complemento (Herr *et al.*, 1985; Peter *et al.*, 1985) continua a ser a técnica de referência da OIE (2003), embora seja menos sensível e os antígenos usados não consigam detectar com alguma frequência a presença de anticorpos em alguns animais (Arricau-Bouvery e Radolakis, 2005).

A ELISA é cada vez mais utilizada (Williams *et al.*, 1986; Kovacova *et al.*, 1987; Peter *et al.*, 1988; Uhaa *et al.*, 1994; Waag *et al.*, 1995).

Diversos estudos têm vindo a demonstrar que a ELISA é mais sensível que a FC (Arricau-Bouvery e Radolakis, 2005; Rousset *et al.*, 2007) e este aspecto é também referido pela OIE (2004). A baixa sensibilidade da técnica de FC tem sido também documentada em avaliações serológicas no Homem (Peter *et al.*, 1985; Worswick e Marmion, 1985; Peter *et al.*, 1987, 1988; Cowley *et al.*, 1992).

As reacções cruzadas podem também estar na origem de dificuldades de interpretação dos testes serológicos, variando segundo a técnica. As principais reacções cruzadas com *C. burnetii* ocorrem com *Legionella pneumophila* (Dwyer *et al.*, 1988; Finidori *et al.*, 1992), *Legionella micdadei* (Dobija-Domaradzki *et al.*, 1984; Musso e Raoult, 1997), *Bartonella quintana* e *Bartonella henselae* (La Scola e Raoult, 1996), podendo ter influência nos resultados, sobretudo nos títulos baixos.

Na prática corrente do diagnóstico da Febre Q, é desejável que a ELISA, mais sensível e mais específica que a FC, seja utilizada preferencialmente a esta (AFSSA, 2004).

Os testes ELISA permitem avaliar um grande número de animais e rebanhos. Contudo,

nenhum destes testes permite a identificação dos animais que eliminam a *C. burnetii* pelas fezes ou pelo leite, uma vez que não existe relação entre a resposta serológica e a excreção. Embora a maioria dos animais que excretam *C. burnetii* pelo muco vaginal, fezes ou leite sejam seropositivos, existe a possibilidade de, por um lado, alguns animais serem seropositivos sem excretarem *C. burnetii*, e, por outro, de alguns animais serem excretadores seronegativos (Berri *et al.*, 2001; Berri *et al.*, 2007). Este último aspecto tem consequências importantes a nível da saúde pública.

À semelhança do que ocorre em medicina humana, seria útil dispor de uma técnica serológica que permitisse distinguir, no animal, os títulos de anticorpos anti-fase I e anti-fase II. A ELISA disponível na Europa (*CHEKIT-Q-Fever enzyme immunoassay kit; Bommeli-IDEXX*) permite a detecção dos anticorpos totais (anti-fase I e II) de *C. burnetii*, enquanto que a FC é realizada com base num antigénio preparado em fase II.

IFA e outras técnicas

O recurso à IFA é mais raro (Martinov *et al.*, 1989; Meskini *et al.*, 1995; Muramatsu *et al.*, 1997; Boni *et al.*, 1998; To *et al.*, 1998; Hatchette *et al.*, 2002). Sendo uma técnica específica para cada espécie, a IFA não é utilizada com frequência no diagnóstico veterinário de Febre Q por não ser adequada a rastreios de larga escala, não ser sistemática e a sua interpretação poder ser subjectiva. Não está disponível nenhum teste de IFA comercializado para medicina veterinária (Arricau-Bouvery e Radolakis, 2005).

Outras técnicas serológicas foram abandonadas: a microaglutinação (Fiset *et al.*, 1969; Kazar *et al.*, 1981; Nguyen *et al.*, 1996), o Radio-Imuno-Ensaio (RIA) (Doller *et al.*, 1984), a hemólise indirecta (Tokarevich *et al.*, 1990), o *Enzyme-Linked-Immunosorbent Fluorescence Assay* (ELIFA) (Schmeer *et al.*, 1988), o Dot Blot e o Western Blot (Blondeau *et al.*, 1990; Willems *et al.*, 1992).

I.4.2. EVIDENCIAÇÃO BACTERIANA

Coloração bacteriana

A técnica mais frequentemente utilizada é a coloração de esfregaços efectuados a partir dos cotilédones da placenta, dos órgãos do feto abortado ou de amostras vaginais. As colorações que permitem evidenciar *C. burnetii* são: Stamp, Ziehl-Neelsen modificado, Gimenez, Giemsa e Koster modificado. A técnica de Stamp é a mais utilizada em França (Gimenez, 1964; Quinn *et al.*, 1994; Russo *et al.*, 1997).

Detecção de ADN bacteriano

Mais recentemente, a amplificação genómica do ADN de *C. burnetii* por PCR permitiu evidenciar as bactérias directamente nas amostras, sendo considerado, actualmente, como uma abordagem promissora.

O PCR pode ser adaptado a uma grande variedade de amostras e é um dos meios mais sensíveis e rápidos para identificar os animais excretadores (Berri *et al.*, 2000, 2001, 2007).

Técnicas de PCR em tempo real estão em fase de desenvolvimento (Harris *et al.*, 2000; Brennan e Samuel, 2003), principalmente para quantificar *C. burnetii* em amostras como o leite (Stemmler e Meyer, 2002).

Isolamento de estirpes

O isolamento da estirpe bacteriana a partir de amostras pode igualmente efectuar-se. Existem três modos de cultura para este tipo de bactérias intracelulares: em animal (cobaia, murganho), em ovo embrionado ou em culturas celulares (Perrin e Bengtson, 1942; Ormsbee, 1952; Williams *et al.*, 1986; Raoult *et al.*, 1990). No entanto, estas técnicas são morosas e dispendiosas. São necessárias medidas de segurança microbiológica de nível 3 para proteger o manipulador e o ambiente, aquando do isolamento, da cultura e da manipulação de amostras suspeitas, particularmente as placentas que podem ser muito ricas em *C. burnetii*.

Tipificação bacteriana

A tipificação bacteriana ainda está em fase de pesquisa. Certos anticorpos monoclonais permitem distinguir isolados (Wen *et al.*, 1991; Sekeyova *et al.*, 1996) ou estados de desenvolvimento da bactéria (Seshadri *et al.*, 1999).

Foram feitas várias tentativas para encontrar marcadores e estratégias moleculares para diferenciar as estirpes de *C. burnetii*. A análise por sequenciação ou PCR-RFLP de genes susceptíveis de apresentar uma forte taxa de variabilidade teve resultados encorajadores (Zhang *et al.*, 1997; Sekeyova *et al.*, 1999).

A outra abordagem de genotipificação é a análise da totalidade do cromossoma, utilizando enzimas de restrição e separação de fragmentos de ADN por electroforese em campo pulsátil (PFGE) para comparação dos perfis obtidos.

Este método possibilitou o estudo de variações genómicas que permitiram caracterizar isolados próximos originados das mesmas áreas geográficas (Vodkin *et al.*, 1986; Jäger *et*

al., 1998; Heinzen *et al.*, 1990; Thiele *et al.*, 1993). Em contrapartida, nenhum genótipo foi associado a uma forma aguda ou crónica da doença, nem a uma forma clínica particular, nem a uma espécie animal hospedeira específica.

I.5 EPIDEMIOLOGIA

Virtualmente todos os animais podem desempenhar o papel de reservatório de *C. burnetii* (Babudieri, 1959; Lang, 1990). De uma forma geral, em todo o mundo, os ruminantes domésticos representam a fonte mais frequentemente identificada de infecção humana e na origem de epidemias que incluem grandes números de pacientes (Norlander, 2000; Marrie, 1990). A seroprevalência é geralmente elevada na população em contacto directo com estes animais (Thibon *et al.*, 1996).

Os ruminantes domésticos têm sido, efectivamente, a fonte de infecção mais comum para o Homem. A descrição e investigação recente de vários surtos de Febre Q, em diferentes países, permitiram confirmar que esta doença é transmitida ao Homem principalmente por exposição directa aos produtos do parto provenientes de animais infectados, através da inalação de aerossóis (Maurin e Raoult, 1999).

Outras vias de infecção têm sido também identificadas com menor frequência, destacando-se a ingestão de produtos lácteos não pasteurizados e o contacto com carraças infectadas (Maurin e Raoult, 1999; Raoult *et al.*, 2000; OIE, 2004).

I.5.1. VIAS DE EXPOSIÇÃO

I.5.1.1. Via aérea

A dose infecciosa mínima é muito baixa, bastando uma única bactéria para infectar um ser humano (Maurin e Raoult., 1999). O aparecimento de casos a distâncias consideráveis entre zonas de excreção e de origem dos aerossóis confirma que basta um inóculo muito reduzido para infectar um indivíduo (Tissot-Dupont *et al.*, 1999).

Em França, em 1996, registou-se uma epidemia de mais de 120 casos. Foi realizado um inquérito caso-testemunha que permitiu pôr em evidência um matadouro com exposição ao ar livre como factor de risco. Este matadouro, local de passagem de pessoas, tinha uma fossa de dejectos ao ar livre, situado a algumas dezenas de metros de um heliporto muito activo. O papel dos aerossóis de *C. burnetii* num ambiente muito frequentado foi, neste caso, evidente, tendo sido identificada maioritariamente uma única fonte (Carrieri *et al.*, 2002).

Papel do vento

O papel do vento na disseminação de aerossóis infectados foi posta em evidência na região

de Etang de Berre (Bouches-du-Rhône), em França, que apresenta uma incidência de casos de Febre Q aguda 5,4 vezes superior à cidade de Marselha. A planície de Crau é um local de explorações de ovinos, com cerca de 70 000 animais, com hábitos de parto ao ar livre. Durante a principal época de partos de Outubro, num ambiente húmido, o mistral sopra com pouca intensidade, provocando um pico mínimo de casos de Febre Q. Pelo contrário, os partos de Março correspondem a um período em que o mistral sopra mais frequentemente e com mais violência, num ambiente seco, o que explica a repartição sazonal de casos, com um pico em Maio-Junho. Além disso, os casos situam-se geograficamente sob o vento da Crau (Tissot-Dupont *et al.*, 1999; 2004).

No Reino Unido, em 1981, a passagem de um veículo de transporte de ovinos esteve na origem de 29 casos urbanos, sem contacto directo com animais (Salmon *et al.*, 1982). Outro surto importante teve lugar em Birmingham em 1989, com 147 casos urbanos, também sem contacto directo com animais. Este surto teve origem numa exploração de ovinos situada ao vento da zona atingida, com uma intensidade não habitual de vento durante o período de exposição (Hawker *et al.*, 1998).

Rebanhos transumantes ou passagem de ovinos

A propósito de uma recente epidemia de mais de 100 casos no vale de Chamonix (França), durante o Verão de 2002, foi efectuado um inquérito de caso-testemunha para pesquisar factores de exposição. Foi encontrada uma associação entre a doença e o facto de ter havido contacto próximo com ovinos e/ou de assistir à transumância de ovinos (http://www.sante.gouv.fr/htm/actu/actu_ss/).

Na Suíça, no vale de Bagnes (Valais), foram diagnosticados 415 casos em 1983, após a passagem de um rebanho de 900 ovinos (Dupuis *et al.*, 1987).

Em Itália, após uma epidemia de 53 casos na região de Vicenza em 1996, o inquérito caso-testemunha pôs em evidência o papel de rebanhos de ovinos que haviam atravessado a zona da epidemia. A seroprevalência destes rebanhos variava entre 45% e 53% (Manfredi *et al.*, 1996).

I.5.1.2. Contacto directo com mamíferos e em particular com ovinos

Em Dezembro de 1996, face ao aparecimento de vários casos clínicos de Febre Q aguda no pessoal que trabalhava na estação de investigação de fisiologia da reprodução do INRA em França, foi efectuado um inquérito sero-epidemiológico a 36 pessoas (Tissot Dupont,

resultados não publicados, citado em AFSSA, 2004). O inquérito demonstrou uma seroprevalência global de 15%, pondo em evidência vários gradientes de exposição segundo a intensidade e a frequência do contacto com os animais, e de acordo com as espécies animais.

I.5.1.3. Contacto com outros mamíferos

O papel dos gatos, principalmente durante o parto e a manipulação de crias recém-nascidas, foi posto em evidência pela primeira vez durante um epidemia familiar em 1984 no Canadá (Kosatsky, 1984) e descrita posteriormente por outros autores (Langley *et al.*, 1988; Marrie, 1988; Pinsky *et al.*, 1991; Matthewman *et al.*, 1997).

A infecção de cães por mordedura de carraças é conhecida desde os anos 50 (Mantovani e Benazzi, 1953). Eles podem também contaminar-se por ingestão de placentas ou de leite de ruminantes infectados ou por aerossóis (Maurin e Raoult, 1999). A infecção de cadelas gestantes pode estar associada a uma mortalidade neonatal dos cachorros (Burahiwalla *et al.*, 1996). O papel dos cães na transmissão ao Homem foi reportado várias vezes por autores canadianos (Marrie *et al.*, 1985; Laughlin *et al.*, 1991; Burahiwalla *et al.*, 1996). Um inquérito realizado em França em cães que vivem em bases militares mostrou uma seroprevalência de 9,8% (Boni *et al.*, 1998).

I.5.1.4. Exposição alimentar

A via digestiva é frequentemente referida como um fonte possível de infecção humana, mas a ingestão de produtos lácteos não pasteurizados, ainda que investigada de forma sistemática em diferentes estudos (Benson *et al.*, 1963; Krumbiegel e Wisniewski, 1970), continua a ser um modo de transmissão menor (AFSSA, 2004).

Estudos conduzidos com voluntários deram origem a resultados variáveis (Benson *et al.*, 1963; Krumbiegel e Wisniewski, 1970). Num dos estudos, 34 voluntários saudáveis consumiram leite contaminado de forma natural durante cerca de um mês. A contaminação real do leite foi confirmada e quantificada através de um modelo com hamsters e ovos embrionados (Krumbiegel e Wisniewski, 1970). Nenhum dos indivíduos desenvolveu sintomas ou seroconversão. Num estudo similar (Benson *et al.*, 1963) os autores puseram em evidência uma seroconversão assintomática. Os diferentes resultados podem ser explicados por diferentes doses e diferentes estirpes utilizados nos vários estudos ou porque não foi totalmente excluída a hipótese de haver outras fontes de contaminação, tais como

contacto directo com animais ou aerossóis.

1.5.1.5. Fauna selvagem

O papel dos animais selvagens é menos conhecido (Marrie *et al.*, 1993). Estas populações constituem um reservatório secundário relativamente aos animais domésticos. As provas serológicas e bacteriológicas demonstraram a extensão da Febre Q na maioria dos países numa grande diversidade de espécies animais e seus ectoparasitas. Pelo contrário, não foi descrita qualquer situação de transmissão da doença ao Homem a partir da fauna selvagem, à excepção do caso que envolveu lagomorfos no Canadá (Marrie *et al.*, 1986).

De forma geral, será de esperar que o risco seja elevado nas populações que têm um contacto próximo com os animais selvagens, tais como os caçadores e os observadores da natureza. No entanto, um estudo mostrou que o risco de infecção por *C. burnetii* era semelhante entre uma população de caçadores e uma população testemunha (Levesque *et al.*, 1995).

A implicação dos reservatórios selvagens foi considerada suspeita na transmissão para a população suburbana da Guiana Francesa, mas as investigações não foram completadas (Gardon *et al.*, 2001). No Japão, foi encontrada uma forte prevalência entre os pássaros que viviam perto de explorações (Hirai e To, 1998). Estes pássaros poderiam desempenhar o papel de transmissores entre as explorações e as populações urbanas.

Também no Japão foram encontradas seroprevalências elevadas (>50%) em diversas espécies de animais selvagens, entre os quais ursos, veados, lebres e macacos (Ejercito *et al.*, 1993). Estas prevalências elevadas nestas espécies podem ser uma potencial fonte de infecção quer para animais domésticos, quer para populações humanas.

Os ratos foram identificados como portadores de *C. burnetii* (Webster *et al.*, 1995; Barandika *et al.*, 2007), podendo estes justificar porque os gatos, enquanto predadores, são importantes na epidemiologia da doença.

Em suma, é possível que a fauna selvagem esteja em causa em alguns casos esporádicos. Esta forma de exposição não deve ser ignorada e o deslocamento de animais selvagens para as proximidades de populações humanas pode contribuir para o aumento da incidência da Febre Q (AFSSA, 2004).

I.5.2. VIAS DE EMISSÃO

A origem da contaminação, que tem em conta as fontes de matéria virulenta e a prevalência da infecção, varia em função das espécies animais envolvidas: ruminantes, carnívoros domésticos ou fauna selvagem.

Para a apreciação da origem da contaminação, convém igualmente distinguir (AFSSA, 2004):

- o ciclo doméstico, caracterizado por uma infecção de bovinos, ovinos, caprinos e eventualmente de carnívoros domésticos rurais, uma contaminação eventual dos seus produtos, essencialmente o leite e os produtos lácteos, e uma circulação desta infecção por contactos directos ou aéreos;
- o ciclo selvagem, caracterizado por uma infecção de ruminantes selvagens, de roedores, de lagomorfos, de pássaros e eventualmente também dos carnívoros domésticos que vivem em meio rural e uma circulação desta infecção por intervenção de carraças e de contactos directos entre os animais.

Estes dois ciclos são relativamente distintos, mesmo que possa haver ocasionalmente interferência entre ambos, por intermédio de interfaces como os carnívoros domésticos, os roedores ou as espécies selvagens contaminadas por aerossóis provenientes de explorações contaminadas.

No que diz respeito ao ciclo doméstico, a excreção é máxima no período de parto.

Os conhecimentos actuais sobre as vias de excreção da bactéria são ainda limitados. Porém, recentemente, têm sido publicados diversos trabalhos experimentais sobre este tema, recorrendo, na sua maioria a técnicas de PCR, que começam a permitir um maior conhecimento das vias de excreção. De uma forma geral, a carga bacteriana é elevada na placenta, nos produtos do parto e nas secreções vaginais, menos no leite, e pouco conhecida nas fezes, na urina e no esperma (AFSSA, 2004).

I.5.2.1. Ruminantes domésticos

Placenta

A bactéria pode ser encontrada na placenta, onde se encontra no termo da gestação, na vaca (Luoto e Huebner, 1950; Plommet *et al.*, 1973), na ovelha (Zeman *et al.*, 1989) e na cabra (Marmion e Watson, 1961).

Uma placenta de ovelha infectada pode conter mais de 10^9 bactérias por grama (Babudieri, 1959; Welsh *et al.*, 1951).

Secreções vaginais

Nos bovinos, uma infecção experimental demonstrou a presença de *C. burnetii* nas secreções vaginais de novilhas nas quais foi inoculada a bactéria (Plommet *et al.*, 1973). *C. burnetii* foi isolada a partir de secreções vaginais de vacas (13/61, 21,3%) recolhidas num rebanho com problemas de reprodução (To *et al.*, 1998) e em 50% recolhidas de rebanhos infectados (Guatteo *et al.*, 2007).

Um estudo de Berri *et al.* (2002) num rebanho de 34 ovelhas, onde tinham ocorrido abortos, revelou a presença de *C. burnetii* nas secreções vaginais de 15 animais após a gestação levada a termo. Dez semanas após o parto, apenas duas ovelhas continuavam a excretar a bactéria através das secreções vaginais.

Recentemente, duas infecções experimentais foram efectuadas em cabras indemnes de Febre Q, com um protocolo semelhante ao anterior: inoculação com uma dose de 10^4 bactérias, por via sub-cutânea, após a primeira metade da gestação. A quase totalidade dos animais abortou (100% no primeiro ensaio, 75% no segundo). A partir do dia do aborto, a pesquisa de *C. burnetii* por PCR demonstrou que todos os animais excretavam nas secreções vaginais (7/7 no primeiro ensaio, 12/12 no segundo) de maneira contínua por um período entre três semanas e cinco semanas. Foi estimado um número de 10^5 a 10^8 bactérias por ml nas amostras positivas e foi demonstrado que estas bactérias eram infecciosas para murganhos (Arricau-Bouvery *et al.*, 2003; Sanchez *et al.*, 2006). As cabras continuaram a excretar durante quatro meses após o surto e algumas após a gestação seguinte (Berri *et al.*, 2007).

Leite

A excreção de *C. burnetii* pelo leite foi demonstrada em bovinos, ovinos e caprinos.

A presença de *C. burnetii* no leite das vacas foi comprovada nalguns trabalhos mais antigos e outros recentes (Schaal, 1977; Durand e Limouzin, 1983; Lorenz *et al.*, 1998; Arricau-Bouvery *et al.*, 2001). O isolamento a partir do leite foi obtido em 16,8% (36/214) de vacas com problemas de fertilidade (To *et al.*, 1998), em 40% de amostras recolhidas de rebanhos infectados com *C. burnetii* (Guatteo *et al.*, 2007) e em 4,7% (17/349) de amostras de leite de tanque recolhidas de queijarias (Fretz *et al.*, 2007).

A excreção é descrita como intermitente, de duração variável, mas podendo persistir durante longos períodos até dois anos no rebanho (Becht e Hess, 1964; Guatteo *et al.*, 2007).

Não existe uma relação específica entre o aparecimento dos sinais clínicos e a excreção (Schaal, 1982; Guatteo *et al.*, 2006). Assim, uma vaca que abortou não se torna necessariamente excretora, e, se for este o caso, esta excreção pode ser de curta duração. No caso do desenvolvimento de metrites, esta excreção parece ser mais estável no tempo, mas esta observação necessita ser confirmada (Arricau-Bouvery *et al.*, 2001).

No interior de um rebanho com serologia positiva, não há relação clara entre a seropositividade individual de uma vaca e a excreção de *C. burnetii* no leite (Guatteo *et al.*, 2006; 2007).

As publicações que relatam a presença de *C. burnetii* no leite de ovelha são mais limitadas. Schaal (1977), apoiando-se nos trabalhos baseados na infecção experimental de 31 ovelhas, mostrou que *C. burnetii*, mesmo que presente no útero, não é detectada na glândula mamária ou no leite. Pelo contrário, a sua presença no leite foi demonstrada em ovelhas 1, 2 e 8 dias após o parto, sendo evidenciada uma boa correlação entre a excreção fecal e mamária (Berri *et al.*, 2001).

Trabalhos realizados em França confirmaram igualmente a presença de *C. burnetii* nas excreções vaginais de ovelhas (AFSSA, 2004). Dois estudos de infecção experimental conduzidos em cabras mostraram a possibilidade da excreção de *C. burnetii* durante 56 dias através do leite, ou seja, até ao fim do primeiro período experimental (Arricau-Bouvery *et al.*, 2003). O segundo estudo reforça estes primeiros resultados, tendo a duração da excreção variado entre três dias, em certos animais, e nove semanas, de forma descontínua, noutros. Outros trabalhos mostraram que a persistência é possível durante, pelo menos, quatro a cinco meses, em infecção natural (Berri *et al.*, 2007).

Não se encontra descrita qualquer relação significativa entre a presença de *C. burnetii* nos esfregaços vaginais e no leite.

Em conclusão, a excreção de *C. burnetii* no leite foi demonstrada em diferentes estudos, tendo uma duração extremamente variável, dependendo da espécie, do local de infecção e da cronicidade da infecção.

Fezes

Após infecção experimental em cabras (Arricau-Bouvery *et al.*, 2003), apenas algumas

excretavam a bactéria nas fezes antes do aborto, mas todas excretavam após o aborto. A excreção de bactérias teve lugar nos 20 dias que se seguiram à infecção e durou 40 dias em média.

C. burnetii foi encontrada de forma esporádica nas fezes de vacas infectadas (Guatteo *et al.*, 2007).

Esperma

Apenas um trabalho reportou o isolamento de bactérias viáveis obtidas a partir de esperma de touros seropositivos (Kruszewska e Tylewska-Wierzbanowska, 1997).

I.5.2.2. Animais de companhia

Os cães e gatos são também reservatórios de *C. burnetii*. Os cães podem ser infectados por mordedura de carraça (Mantovani e Benazzi, 1953), por ingestão de produtos contaminados, como a placenta, ou por aerossóis. Os cães e gatos que vivem em meios rurais têm, assim, numerosas ocasiões de contacto e, conseqüentemente, de infecção com ruminantes das explorações, sendo possível que a infecção destes animais acompanhe a dos rebanhos infectados.

À excepção de trabalhos que reportam contaminações humanas, provavelmente com origem em carnívoros domésticos (Boni *et al.*, 1998, Marrie *et al.*, 1985), existem poucos dados que permitam conhecer a prevalência desta infecção nessas espécies.

Bacellar *et al.* (1995) testaram 104 cães do canil de Setúbal, dos quais 4,8% tinham anticorpos anti – *C. burnetii*. A zona amostrada corresponde a uma zona urbana. Boni *et al.* (1998) testaram por imunofluorescência, com antigénios fase I e fase II, 429 cães pertencentes a bases militares em diferentes países, dos quais 9,8% (França), 11,6% (Senegal), 8,3% (Costa do Marfim) e 5,2% (Guiana Francesa) eram seropositivos.

Um estudo efectuado no Japão (Komiya *et al.*, 2003) revelou que 14,3% dos gatos domésticos (44/310) eram seropositivos para *C. burnetii*, enquanto que entre os gatos errantes, a seroprevalência era de 41,7% (15/36), sublinhando o papel deste últimos na transmissão da doença.

A infecção de cadelas gestantes foi associada a mortalidade de cachorros à nascença (Buhariwalla *et al.*, 1996). Diversos autores reportaram a ocorrência de infecção humana a partir de contacto com cães (Marrie *et al.*, 1985; 1988; Laughlin *et al.*, 1991; Buhariwalla *et al.*, 1996), tendo sido isolada *C. burnetii* a partir de útero de cadelas no Canadá (Maurin e

Raoult, 1999).

I.5.2.3. Aves

C. burnetii foi isolada a partir de pombos, galinhas, patos, gansos e perus (Babudieri, 1959). Em França, a infecção foi observada pela primeira vez em corvos nos Alpes em 1968 (Seigneurin e Seigneurin, 1968).

Galinhas infectadas experimentalmente excretaram *C. burnetii* nas fezes durante 40 dias a partir do sétimo dia após a infecção (Raska e Syrucek, 1956).

A contaminação humana pode fazer-se por inalação de partículas infectadas provenientes de excrementos secos, o que explica a microepidemia familiar reportada após limpeza de um velho pombal desocupado (Stein e Raoult, 1999).

I.5.2.4. Outros vertebrados

C. burnetii pode também ser isolada, de forma ocasional, em numerosos outros mamíferos, selvagens ou domésticos, como cavalos, coelhos selvagens, porcos, dromedários, búfalos e ratos (Babudieri, 1959). Foram detectados anticorpos em diversas espécies de serpentes e de tartarugas na Índia, mas *C. burnetii* não foi isolada nestes animais (Babudieri, 1959). Foi descrita uma placentite devida a *C. burnetii* numa foca (Lapointe *et al.*, 1999). Os coelhos foram também já implicados na transmissão *C. burnetii* no Homem (Marrie *et al.*, 1986).

Um estudo seroepidemiológico inglês, efectuado em ratos, mostrou uma prevalência de anticorpos anti-fase II que variou entre 7 e 53% (Webster *et al.*, 1995). Os autores avançam a hipótese de os ratos poderem representar um reservatório principal de *C. burnetii* a partir do qual os animais domésticos, e em particular os gatos, se infectariam.

I.5.2.5. Artrópodes

A maioria dos mamíferos e aves desenvolve uma bacteriemia transitória rapidamente após a infecção por *C. burnetii*. As carraças podem, assim, ingerir a bactéria quando se alimentam. Mais de 40 espécies de carraças são naturalmente infectadas por *C. burnetii*, entre as quais *Rhipicephalus sanguineus* (Mantovani e Benazzi, 1953; Spyridaki *et al.*, 2002), onde ocorre multiplicação bacteriana. A infecção experimental de cobaios por picada de carraça infectada foi demonstrada com *Ixodes holocyclus*, *Haemaphysalis bispinosa* e *Rhipicephalus sanguineus* (Smith, 1940; 1941), assim como com *Dermacentor andersoni* (Parker e Davis, 1938).

C. burnetii foi também encontrada nos ovários da carraça, o que sugere uma transmissão vertical e a persistência de infecção na descendência (Babudieri, 1959). Apesar disto, as carraças não são consideradas como uma fonte importante de infecção para animais (Babudieri, 1959).

Pelo contrário, as carraças têm provavelmente um papel importante na transmissão de *C. burnetii* entre vertebrados selvagens, principalmente roedores, lagomorfos e aves (Babudieri, 1959; Marrie *et al.*, 1986; Lang, 1990). *C. burnetii* foi igualmente isolada a partir de outros artrópodes, tais como os trombiculídeos (Babudieri, 1959), os piolhos (Giroud e Jardin, 1954) e as moscas (Philip, 1948; Nelder *et al.*, 2008).

O seu papel na infecção humana permanece controverso, não sendo muito valorizado em França (AFSSA, 2004), mas considerado noutros países como a Alemanha (Parecer do «Bundesinstitut für Risikobewertung de 17 Junho de 2003, sobre «a opinião dos peritos sobre a importância da Febre Q para a saúde dos consumidores», disponível em www.bfr.bund.de), a Suíça (Eklund *et al.*, 1947; Janbon *et al.*, 1989) e o Brasil (Nelder *et al.*, 2008).

1.5.3. AMBIENTE

O ambiente é considerado como origem de contaminação devido aos aerossóis formados a partir das secreções dos animais infectados. Estes foram encontrados no ar até duas semanas após o parto, e por um período de 150 dias no solo (Welsh *et al.*, 1957), podendo ser transportadas pelo ar a longas distâncias (Tissot-Dupont *et al.*, 1999). O vento, o tempo seco e vegetação árida são também factores que favorecem a disseminação de *C. burnetii* (Tissot-Dupont *et al.*, 2004). Mais recentemente, *C. burnetii* foi isolada a partir de feno (Rustscheff *et al.*, 2000) e foi detectada por técnica de PCR em amostras de poeiras colhidas num estábulo (Yanase *et al.*, 1998).

A estação e o maneio da exploração, ou seja, se o partos ocorrem no exterior ou no interior, a deslocações de rebanhos ou a fertilização do solo com estrume podem ter uma grande influência sobre o grau de contaminação do ambiente.

1.5.4. PRODUTOS ALIMENTARES DE ORIGEM ANIMAL

Devido à presença de *C. burnetii* em diversos órgãos, foi colocada a hipótese de infecção humana através do consumo de carne. Porém, contrariamente aos numerosos elementos

publicados sobre a excreção no leite, não foram encontradas referências bibliográficas disponíveis sobre o risco ligado à carne (AFSSA, 2004).

Leite como matéria prima

A presença de *C. burnetii* no leite pode ser devida a excreção mamária ou a contaminação fecal ou ambiental. Ainda que a excreção mamária esteja confirmada, não existem estudos suficientes sobre a quantificação da contaminação fecal ou ambiental (AFSSA, 2004).

Durand (1993) estima que a excreção no leite de vaca seja na ordem das 10-20 bactérias/ml, mas outros trabalhos citam cifras como 10⁵ células/ml (Bell, 1949).

Os resultados obtidos nos modelos animais permitem estabelecer “doses infecciosas” para um determinado modelo e por uma via de inoculação precisa.

Sobrevivência nos produtos lácteos

Foi observada sobrevivência de *C. burnetii* durante várias semanas em queijos de pasta mole (Sipka, 1959), durante 41 dias na manteiga (Lerche, 1965) e foi demonstrada a sua dispersão durante a fase de acabamento de certos tipos de queijo de pasta dura «Hartkäse» (Kaestli, 1965). No entanto, estes resultados carecem de confirmação por métodos de quantificação validados.

A implicação dos produtos lácteos pasteurizados como fonte possível de infecções humanas foi sugerida numa publicação baseada num estudo epidemiológico (Hatchette *et al.*, 2001). Os mesmos autores afirmam, contudo, que a pasteurização é suficiente para eliminar *C. burnetii* no leite (Enright *et al.*, 1957), referindo que o consumo de leite cru não foi associado a um risco acrescido neste inquérito epidemiológico e que *C. burnetii* não foi encontrada no queijo em causa.

Termoresistência

A questão da termoresistência foi estudada utilizando um modelo animal (Enright *et al.*, 1957; Lenette *et al.*, 1951) e reexaminada por outros autores. Schaal (1977) estima que temperaturas de 72 a 74° C durante 30 a 40 segundos serão suficientes para eliminar as bactérias. O mesmo autor analisou entre 1958 e 1967, 4997 amostras de leite pasteurizado tratados por UHT, não tendo encontrado amostras positivas. A análise do mesmo número de amostras de leite cru, demonstrou a existência de 0,94% de casos positivos (Schaal e Schaaf, 1969).

Ovos

C. burnetii foi detectada por PCR em ovos (4,2%) e em maionese (17,6%) no Japão (Tatsumi *et al.*, 2006). O número de bactérias foi estimado em 10^4 e 10^6 por ovo. Num outro rastreio em ovos comerciais realizado na Suíça, pelo contrário, todos os ovos testados eram negativos para *C. burnetii* (Fretz *et al.*, 2007).

1.5.5. PREVALÊNCIA DA FEBRE Q NOS ANIMAIS

Portugal

Não existem dados sobre a prevalência da Febre Q em ruminantes em Portugal.

Os únicos dados disponíveis são os casos de Febre Q em ruminantes, sobretudo em bovinos, publicados pela Direcção Geral de Veterinária (DGV) entre 1998 e 2002 (DGV, 2004) (Tabela 3) e reportados à OIE (*Office International des Epizoties*) (Tabela 3) entre 1998 e 2004, não estando disponível a origem geográfica dos mesmos, nem dados relativos aos anos 2005-2007.

Tabela 2: Número de casos em animais em Portugal, declarados à DGV, entre 1998 e 2002

ANO	N.º DE ANIMAIS POSITIVOS		
	BOVINOS	OVINOS	CAPRINOS
1998	53	5	0
1999	3	0	1
2000	11	0	0
2001	24	0	0
2002	34	0	0

Fonte: DGV, 2004

Tabela 3: Número de casos em animais em Portugal, declarados à OIE, entre 1996 e 2004

Espécie	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004
bovinos	-	-	53	3	11	24	34	10	17
Ovinos			5	0	0				
caprinos			0	1	0				

Fonte: HandiStatus, OIE (2004)

Outros países

Alguns estudos recentes foram realizados com animais (Tabela 4) e indicam que a doença é endémica em todo o mundo.

Tabela 4: Seroprevalência da Febre Q em animais obtida nos principais rastreios mais recentes em todo o mundo.

País	Ano	Nº de animais testados	Nº de explorações	Teste utilizado	Seroprevalência de animais (% de explorações)	Referência
Bovinos						
Chade	1999-2000	195	19	ELISA	4(37)	Schelling <i>et al.</i> , 2003
Turquia	1998	416	48	IF	6	Cetinkaya <i>et al.</i> , 2000
Alemanha	1998	21 191	ND	ELISA	8	Hellenbrand <i>et al.</i> , 2001
Itália	1998	544	21 ^a	IF	13	Capuano <i>et al.</i> , 2001
		486	26 ^b		20	
		155	6 ^c		2	
Albânia	1995-1999	571	ND	ELISA	7,9	Çekani <i>et al.</i> , 2008
Ovinos						
Itália	1999-2002	7194	675	ELISA	9(38)	Masala <i>et al.</i> , 2004
Chade	1999-2000	142	28	ELISA	11(43)	Schelling <i>et al.</i> , 2003
Alemanha	1998-1999	1 346	ND	ELISA	1,3	Hellenbrand <i>et al.</i> , 2001
		100	1		57	
Turquia	1998	411	47	IF	10,5	Cetinkaya <i>et al.</i> , 2000
Albânia	1995-1999	1085 ^d	ND	ELISA	9,8	Çekani <i>et al.</i> , 2008
Caprinos						
Itália	1999-2002	2155	104	ELISA	13(47)	Masala <i>et al.</i> , 2004
Chade	1999-2000	134	28	ELISA	14(46)	Schelling <i>et al.</i> , 2003
Alemanha	1998	278	ND	ELISA	2,5	Hellenbrand <i>et al.</i> , 2001
Albânia	1995-1999	1085 ^d	ND	ELISA	9,8	Çekani <i>et al.</i> , 2008
Outros						
Japão	2003	310 gatos domésticos	ND	IF	14	Komiya <i>et al.</i> , 2003
		36 gatos errantes			42	
Coreia	2003	116 gatos domésticos	ND	IF	9	Komiya <i>et al.</i> , 2003
Chade	1999-2000	142 camelos	14	ELISA	80(100)	Schelling <i>et al.</i> , 2003
Indonésia	1999	327 ratos	2	IF	0	Ibrahim <i>et al.</i> , 1999
^a Bovinos mantidos em instalações fechadas todo o ano ^b Bovinos mantidos em instalações fechadas durante o Inverno e em pastoreio na Primavera ^c Bovinos mantidos ao ar livre todo o ano ^d ovinos e caprinos ND: não determinado						

Adaptado de Arricau-Bouvery e Radolakis, 2005

I.6 MEDIDAS DE BIOSSEGURANÇA

Uma vez que a Febre Q é uma doença transmitida principalmente por via aerógena, as medidas de prevenção e controlo da doença visam impedir a exposição do Homem à infecção de origem animal e ambiental.

I.6.1. PROFILAXIA SANITÁRIA

I.6.1.1. Medidas de higiene gerais

De forma a reduzir a contaminação ambiental e animal, várias medidas de ordem profiláctica podem ser postas em prática, tais como desinfecção, isolamento de animais doentes, destruição de placentas e produtos resultantes do aborto, luta contra carraças, vigilância dos canídeos, controlo das trocas de animais, higiene do pessoal, entre outras medidas genéricas de higiene e de boas práticas (AFSSA, 2004).

I.6.1.2. Desinfectantes

A exposição prolongada, durante 24 a 48 horas, ao formol concentrado (> 10%), a éter, a clorofórmio a 5%, a ácido clorídrico a 5%, a cloramina a 3% e a etanol a 70% é bactericida (Scott e Williams, 1990). Os excrementos podem ser decontaminados com cianamida cálcica a uma concentração final de 0,4% durante uma semana (Arricau-Bouvery *et al.*, 2001).

I.6.2. MEIOS DE PROFILAXIA MÉDICA

I.6.2.1. Antibióticos

C. burnetii é sensível *in vitro* e *in vivo* a diversos antibióticos, tais como tetraciclina, macrólidos, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (AFSSA, 2004). Um tratamento adaptado pode, assim, permitir limitar a excreção das bactérias para o ambiente.

Diferentes ensaios *in vitro* mostram que os antibióticos testados são bacteriostáticos, mas que apenas a associação da doxicilina com agentes com tropismo para os lisosomas, tais como a cloroquina a amantadina ou o cloreto de amónio, permitem obter uma actividade bactericida através da alcalinização do ambiente de *C. burnetii*, o que potencializa a acção das tetraciclina (Maurin *et al.*, 1992).

Em medicina veterinária apenas se encontra preconizada a utilização das tetraciclina

(Arricau-Bouvery e Rodolakis, 2005).

O tratamento oral com tetraciclina na dose de 8 mg/kg/dia durante 30 dias (Behymer *et al.*, 1977) em duas vacas infectadas naturalmente com *C. burnetii* não impediu por completo a excreção nas secreções mamárias, nem impediu o nascimento de um nado-morto 31 dias após o início do tratamento. Não foi possível isolar *C. burnetii* a partir de placenta, de colostro e dos órgãos do vitelo morto, embora este fosse seropositivo. Os autores concluíram que este vitelo estava infectado antes do início do tratamento, que este tratamento era eficaz e deve ser recomendado para as vacas leiteiras, cujo leite é comercializado, ou nas regiões onde a incidência da Febre Q é elevada.

O tratamento de 300 ovelhas com 20 mg/kg de oxitetraciclina aos 105 e 120 dias (Berri *et al.*, 2002) num rebanho de ovinos naturalmente infectados, não impediu a excreção durante o parto. A ausência de lote controlo não tratado não permitiu, contudo, retirar quaisquer conclusões.

A oxitetraciclina injectável em formulação de longa acção é considerada como o antibiótico de escolha, ainda que a sua eficácia sobre a excreção de *C. burnetii* não seja significativa (AFSSA, 2004). Por razões económicas, os tratamentos são, geralmente, limitados a uma ou duas injeções no final da gestação, o que é insuficiente para suprimir a excreção quer através placenta (Woernle *et al.*, 1985), quer as secreções vaginais (Berri *et al.*, 2002) e leite (Arricau-Bouvery, resultados não publicados, citada em AFSSA, 2004).

I.6.2.2. Vacinas para animais

Nos ruminantes, a única forma eficiente de prevenir os abortos provocados por Febre Q e a excreção de *C. burnetii* é através da vacinação dos animais nos rebanhos infectados e naqueles que, não estando infectados, se encontrem próximos destes (Rodolakis, 2006).

Foram desenvolvidas várias vacinas para este efeito que podem variar relativamente à sua composição, no que diz respeito à estirpe e à fase de *C. burnetii* utilizadas. As vacinas preparadas a partir da fase I das bactérias mostraram ser mais protectoras do que as de fase II (Arricau-Bouvery *et al.*, 2005). Foi encontrada protecção cruzada entre as várias estirpes de *C. burnetii* em cobaios vacinados (Ormsbee *et al.*, 1964). Quando testadas em bovinos e ovinos, estas vacinas apresentaram efeitos de protecção diferentes em caso de infecção experimental ou infecção natural por *C. burnetii* em animais seronegativos (Aitken, 1989; Behymer *et al.*, 1976; Brooks *et al.*, 1986; Schmeer *et al.*, 1987; Williams *et al.*, 1993).

Nos bovinos, a maior parte dos ensaios de vacinação foram realizados em animais repostos em meio naturalmente infectado. A vacinação com um vacina em fase I demonstrou ser eficaz contra abortos, excreção pelo leite e contaminação das placentas em vacas vacinadas e recolocadas nos rebanhos naturalmente infectados, embora algumas continuassem a excretar teores muito reduzidos de bactérias no leite após a vacinação (Behymer *et al.* 1976, Biberstein *et al.*, 1977; Sadecky *et al.*, 1975 a; Sadecky *et al.*, 1975 b; Sadecky e Brezina, 1977). A vacinação de rebanhos em anos seguidos com uma vacina em fase I ou II associada à eliminação das vacas excretoras conduziu à eliminação da excreção no leite por estas vacas, enquanto que a vacinação com vacinas em fase II, ou a sua utilização em associação com tetraciclina, apenas diminuiu essa excreção (Durand, 1993; Schmeer *et al.*, 1987).

Estes resultados permanecem, no entanto, como meramente indicativos, uma vez que certos estudos são limitados no tempo e nem sempre foi devidamente provado o contacto com o agente infeccioso. Por outro lado, a inibição da excreção pelo leite poderia ter estado ligada à evolução normal da doença nos animais. Behymer *et al.* (1976) testaram, em três vacas, a eficácia de uma vacina constituída pela estirpe Nine Miles em fase I, face a desafio experimental com uma estirpe virulenta, demonstrando que a excreção no leite diminuiu fortemente após a vacinação.

Até 2004, a única vacina disponível para caprinos era uma combinação inactivada de *Chlamydia abortus* e *C. burnetii* fase II que, no entanto, se revelou pouco eficaz contra a excreção bacteriana pelo leite (Fishbein e Raoult, 1992). Um estudo mais recente (Arricau-Bouvery *et al.*, 2005) comparou a eficácia de uma vacina com *C. burnetii* fase I e de uma com *C. burnetii* fase II contra o aborto e a excreção de *C. burnetii* pelas fezes, leite, secreções vaginais e placentas de cabras infectadas experimentalmente. Nestas condições experimentais, a vacina de fase I demonstrou maior prevenção que a de fase II. A primeira inibiu também a contaminação do leite e reduziu drasticamente a duração, intensidade e frequência da excreção vaginal e fecal (diminuição do número de bactérias de um factor de 10^4 para 10^5 nas secreções vaginais e nenhuma amostra de leite positiva para estas cabras).

Vários estudos foram realizados em ovinos, mas apenas a resposta serológica foi avaliada. O estudo de Brooks *et al.* (1986) demonstrou que duas vacinas em fase I reduziam a excreção através do colostro após inoculação de 10^4 *C. burnetii* da estirpe Nine Mile aos 100 dias de gestação. Um outro estudo realizado em seis ovelhas demonstrou que a vacinação com uma vacina em fase I administrada às sete semanas de gestação prevenia a

excreção no leite das ovelhas provenientes de um rebanho naturalmente infectado (Sadeky e Brezina, 1977).

De uma forma geral, com base nos trabalhos apresentados, pode concluir-se que a vacinação com uma vacina com *C. burnetii* em fase I é uma medida eficaz para controlar a Febre Q e para reduzir a contaminação ambiental, diminuindo, desta forma, o risco de transmissão ao Homem. O uso alargado de uma vacina deste tipo em bovinos na Eslováquia nos anos 1970 e 1980 diminuiu significativamente a ocorrência de Febre Q naquele país (Kovacova e Kazar, 2002).

Até agora a eficácia da vacina não foi testada em condições experimentais em ovinos gestantes, mas os resultados obtidos com a vacinação de caprinos abrem perspectivas promissoras (Rodolakis, 2006).

II. RASTREIO SEROLÓGICO

II.1 INTRODUÇÃO

A Febre Q, sendo uma zoonose reconhecida internacionalmente e de declaração obrigatória, continua a ser uma doença pouco conhecida em Portugal. Os casos Humanos reportados à Direcção Geral de Saúde (DGS) indicam a existência do agente no país, mas são escassos os dados relativos à sua presença nas espécies animais. Sabendo que são os animais domésticos, particularmente os ruminantes, a fonte de contaminação para os Humanos, é fundamental o conhecimento da prevalência de *C. burnetii* nestas espécies. Neste sentido, foi planeado um estudo epidemiológico da Febre Q em ovinos, sob a forma de um rastreio serológico.

II.2 OBJECTIVOS

O rastreio serológico efectuado visou determinar a circulação do agente da Febre Q, *C. burnetii*, nos rebanhos de ovinos do concelho em estudo, de forma a:

- estimar a prevalência de rebanhos com animais que apresentem serologia positiva à *C. burnetii*, no concelho em estudo,
- estimar a seroprevalência dentro dos rebanhos positivos,
- comparar os resultados obtidos com dados bibliográficos relativos a outros países europeus.

II.3 MATERIAL E MÉTODOS

II.3.1. ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO

Foi realizado um estudo observacional transversal e descritivo sob a forma de rastreio seroepidemiológico.

II.3.1.1. Selecção e caracterização das áreas de estudo

A área geográfica em estudo corresponde aos concelhos abrangidos pela Organização de Produtores Pecuários (OPP) de Montemor-o-Novo, na sua maioria pertencentes ao distrito de Évora. A selecção deste concelho deveu-se ao seu elevado efectivo ovino e ao facto de terem sido notificados casos de Febre Q em Humanos em anos anteriores na região do Alentejo.

Figura 6: Região abrangida pela OPP de Montemor-o-Novo



II.3.1.2. Caracterização da população da área em estudo: número de explorações, número de animais, e suas localizações geográficas

Em Novembro de 2006 foi feito o levantamento das explorações de ovinos pertencentes à OPP de Montemor-o-Novo. De acordo com a listagem fornecida pela Cooperativa Agrícola de Compra e Venda de Montemor-o-Novo (COPRAPEC), foi identificado um total de 1458 explorações, distribuídas por 8 concelhos, 7 dos quais pertencentes ao Distrito de Évora e 1 (Alcácer do Sal) ao Distrito de Setúbal.

Tabela 5: Explorações abrangidas pela OPP de Montemor-o-Novo.

Concelho	Nº explorações
Alcácer do Sal	184
Arraiolos	165
Évora	424
Montemor	436
Portel	9
Redondo	1
Vendas Novas	90
Viana Alentejo	149
Total	1458

Após este levantamento, foi traçado um plano de amostragem em que foi definido o número de amostras recolhidas em cada uma das etapas do estudo.

Por condicionantes económicas e de disponibilidade de testes, optou-se por limitar o estudo ao concelho de Montemor-o-Novo.



Figura 7: Mapa do concelho de Montemor-o-Novo

II.3.1.3. Populações animais estudadas e amostragem

A população em estudo corresponde aos ovinos abrangidos pelo plano nacional de erradicação da Brucelose, pertencentes ao concelho de Montemor-o-Novo, cujas análises são enviadas para o Laboratório da COPRAPEC.

Foi efectuada uma amostra probabilística aleatória a diferentes níveis: foram seleccionadas as explorações (unidades de amostragem primária) e, dentro de cada exploração foi seleccionado o número de animais (unidades de amostragem secundária).

II.3.1.3.1. Selecção do número de explorações

Das 436 exploração existentes no concelho de Montemor-o-Novo em Novembro 2006, foram seleccionadas 79. O tamanho da amostra foi calculado para um nível de confiança (α) de 95% e aceitando um erro absoluto (L) de 10%. O valor de prevalência esperada (P) foi definido em 50%, uma vez que não existem dados concretos sobre esta doença tendo como unidade de amostragem a exploração. O cálculo do tamanho da amostra foi efectuado através do Win episcopo 2.0, no programa de cálculo de amostras para estimar a percentagem de doença.

Este cálculo tem por base os seguintes fundamentos estatísticos:

- 1) o valor do erro padrão (SE) para a prevalência de explorações positivas é calculado mediante a fórmula $SE = \sqrt{P(1 - P)}$

o número mínimo da amostra (n) é calculado pela fórmula $n = (t \times SE / L)^2$, em que t é o valor de Student t que, neste caso é de 1,96, para um nível de confiança de 95%

dos cálculos anteriores obtém-se $n=96$

como a fração da amostra (F), calculada segundo a fórmula $F=n/N$, em que N é o número de unidades em estudo da população (N= 436) tem um valor superior a 5% (22%), o valor de n é corrigido através da fórmula $n(c) = n/(1 + F)$, obtendo-se um valor $n(c)=79$, o número mínimo de amostra corrigido.

Com base na lista das explorações pertencentes à população do concelho em estudo, foi realizada uma amostragem aleatória simples, através do programa Microsoft Excel.

II.3.1.3.2. Selecção do número de animais em cada exploração

Para a determinação do número de animais a seleccionar dentro de cada exploração foram seguidas duas abordagens em paralelo, aplicadas individualmente a cada uma das explorações seleccionadas, uma vez que não era conhecido o seu estatuto relativamente à seroconversão para a doença:

- cálculo da amostra necessária para a detecção de doença,
- cálculo da amostra para o cálculo de seroprevalência intra-exploração.

Para determinação do número mínimo da amostra necessário para determinação de seroprevalência intra-exploração foi utilizada a metodologia descrita para o cálculo do número de explorações (secção II.3.1.3.1), a partir do total de animais dessa mesma

exploração, para $L=10\%$, $\alpha=95\%$ e $P=10\%$. O valor de prevalência esperada (P) foi extrapolado a partir de prevalências descritas para ovinos em estudos efectuados em outros países da Europa (Cetinkaya *et al.*, 2000; Schelling *et al.*, 2003; Masala *et al.*, 2004; Manteca, 2005).

A determinação do número mínimo da amostra necessária para detecção de doença foi também efectuada através do Win episcopo 2.0, no programa de cálculo de amostras para a detecção de doença, para $\alpha=95\%$ e $P=10\%$.

Neste caso, o cálculo do número mínimo da amostra baseia-se na seguinte fórmula: $n = \lceil [1 - 1(1 - \alpha)^{1/d}] \times [N - d] \rceil + 1$, em que α é a probabilidade de encontrar pelo menos um caso positivo na amostra, d o número mínimo esperado de animais infectados na exploração, N o tamanho da exploração e n o tamanho da amostra mínima (Thrusfield, 2007).

O número final de animais seleccionado dentro de cada exploração correspondeu, em cada caso, ao maior dos valores obtidos em cada uma das abordagens, de modo a ser possível, em cada exploração, determinar a presença de doença de forma a poder classificar as explorações como positivas ou negativas à Febre Q e, nas explorações positivas, determinar as seroprevalências.

II.3.1.4. Preparação e recolha de amostras

Foi efectuada a recolha das amostras de sangue dos animais de 35 das explorações seleccionadas, pois algumas das explorações constantes da base de dados tinham entretanto sido extintas.

A recolha foi efectuada pelos Médicos Veterinários da OPP em visitas às explorações seleccionadas, no âmbito do programa sanitário de erradicação da Brucelose, entre Dezembro de 2006 e Outubro de 2007. As amostras foram depois entregues no Laboratório da COPRAPEC em Montemor-o-Novo, onde foram centrifugadas. Os soros, separados para microtubos de 1,5 ml, foram congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até serem processados por ELISA no laboratório de bacteriologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa.

II.3.1.5. Recolha de dados relativos às explorações

As amostras individuais de soro foram acompanhadas por uma listagem das explorações de origem, onde constava a identificação da exploração, a freguesia a que pertence, a data de recolha e o número das amostras de sangue recolhidas em cada exploração.

Posteriormente foi contactada a OPP, no sentido de obter os dados actualizados relativos ao tamanho do efectivo no momento da colheita, isto é, número total de explorações registadas no concelho de Montemor-o-Novo durante o ano de 2007 e o número total de animais em cada exploração.

Estes dados foram inseridos numa base de dados em Microsoft EXCEL.

II.3.2. TÉCNICA LABORATORIAL

Os soros foram testados para a presença de anticorpos específicos para *C. burnetii* com o teste ELISA comercial (*CHEKIT-Q-Fever enzyme immunoassay kit; Bommeli-IDEXX*). Este teste, referido pela OIE (OIE, 2004), permite detectar anticorpos específicos anti *C. burnetii* em fase I e II, em amostras de soro, plasma e leite de ruminantes, conforme indicado pelo fabricante. No entanto, apenas o soro é referido pela OIE.

II.3.2.1. Princípios e descrição da técnica

As placas de microtitulação são revestidas por antigénios purificados de *C. burnetii* fase I e fase II, sendo disponibilizados soros controlo negativo e positivo, o tampão de diluição e de lavagem, bem como o substrato enzimático TMB. O cálculo do título dos soros problema é efectuado por comparação da sua Densidade Óptica (DO) com a dos controlos positivos. A DO da amostra é expressa como percentagem do valor da DO do controlo positivo, o qual se considera como 100%. Segundo indicação do fabricante, os soros são considerados positivos quando têm uma percentagem de DO de 40% ou mais, duvidosos se a percentagem estiver entre 30% e 40% e negativos, se a percentagem for inferior a 30%.

II.3.2.2. Especificidade e sensibilidade do teste

O teste utilizado tem uma elevada sensibilidade e especificidade. O fabricante apresenta uma correlação do Kit CHEKIT Q Fever ELISA com o teste de fixação do complemento num ensaio realizado com 81 amostras provenientes de explorações de caprinos (Tabela 6).

Tabela 6: CHEKIT Q Fever ELISA e Teste da Fixação do Complemento: comparação

Sensibilidade		
(Exploração infectada. Total de 16 animais):		
CHEKIT Q Fever	16/16	→100%
FC	15/16	→93%
(Exploração infectada. Total de 21 animais):		
CHEKIT Q Fever	21/21	→100%
FC	21/21	→100%
Especificidade		
(Três explorações negativas. Total de 44 animais):		
CHEKIT Q Fever	44/44	→100%
FC	44/44	→100%

Adaptado de Schalch L, Russo P, De Sa C, Reynaud A, Bommeli W. Combined testing of ruminant serum samples for *Chlamydia psittaci* and *Coxiella burnetii* specific antibodies by ELISA. Proceedings from: VIth Congress FeMeSPRum; May 14–16, 1998; Postojna, Slovenia; 514–18.

II.3.2.3. Processamento de amostras – protocolo experimental

Em cada placa ELISA foram testadas, em duplicado, 46 amostras de soro pré-diluídas.

Foram processadas e analisadas 726 amostras de soros sanguíneos individuais.

Diluição e distribuição das amostras:

As amostras, bem como os soros teste positivo e negativo, são diluídas a 1:400 em solução de lavagem diluída previamente a 1:10 em água destilada. São posteriormente distribuídos 100µl de cada um dos soros diluídos em cada um dos pocilhos. Quer as amostras, quer os soros teste, foram testados em duplicado. Após leve agitação, a placa é incubada na estufa durante 60 minutos (± 5 minutos) a 37° C ($\pm 2^\circ$ C).

Após a incubação, efectua-se três lavagens com solução de lavagem diluída a 1:10, no aparelho de lavagem de placas de ELISA (Labsystems Wellwash 4 MK2).

Incubação com o conjugado:

Os anticorpos são detectados pela adição de 100µl do soro de anti-IgG de ruminante, marcado com peroxidase.

Após leve agitação, a placa vai novamente a incubar, durante 60 minutos (± 5 minutos) a 37° C ($\pm 2^\circ$ C), em câmara húmida, seguindo-se um novo passo de três lavagens com a solução de lavagem.

Incubação com o substrato:

São distribuídos 100µl do substrato TMB e depois é feita mais uma incubação da placa,

durante 15 minutos, à temperatura ambiente (18° C – 25° C). Esta reacção é, então, parada pela adição de 100µl de uma solução de ácido sulfúrico a cada pocilho.

Leitura do teste:

Após a paragem do desenvolvimento da cor, pela adição da solução de paragem da reacção (Figura 8), é determinada a densidade óptica a um comprimento de onda de 450 nm, num espectrofotómetro. Os resultados das leituras ópticas são registados através do software Ascent, sob a forma de um esquema da placa, contendo os valores das densidades ópticas de cada pocilho correspondente.

As placas foram lidas nas duas horas seguintes à adição da solução de paragem da reacção. A Figura 8 mostra o aspecto de uma placa nestas circunstâncias.

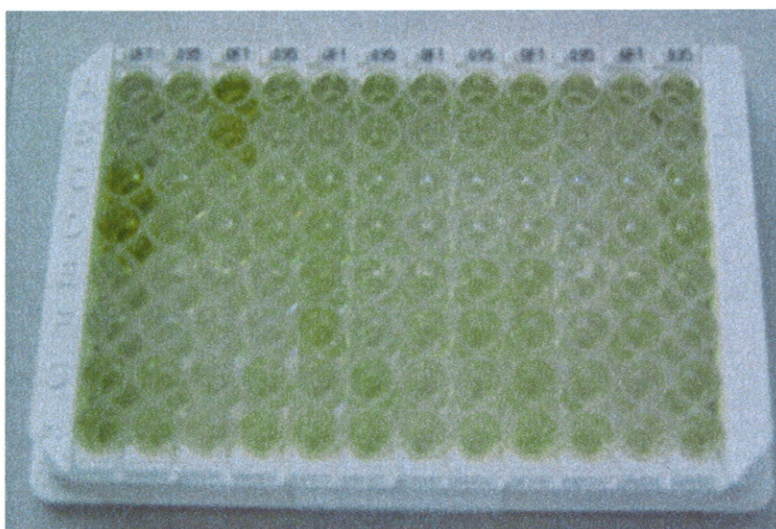


Figura 8: Aspecto de uma placa do teste ELISA CHEKIT-Q-Fever Após adição da solução stop, pronta para leitura de densidade óptica

II.3.2.4. Cálculo dos resultados

A partir dos valores de leitura óptica obtidos, foram realizados os cálculos para a validação dos resultados de ELISA.

Foram calculadas as médias das DO do soro positivo e do soro negativo. Foram calculadas as médias da DO de cada amostra de soro, uma vez que estas foram testadas em duplicado. As médias da DO do controlo positivo (DOPos) e as médias de DO de cada um dos soros teste (DOTeste) foram corrigidas através da subtracção da média da DO do controlo negativo (DOneg):

Controlo positivo: DO_{pos} - DO_{neg}

Soros teste: DO_{teste} - DO_{neg}

A percentagem de positividade (PP) dos soros teste, é calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$PP (\%) = DO \text{ corrigida dos soros teste} / DO \text{ corrigida do controlo positivo} \times 100$$

ou seja:

$$PP (\%) = (DO_{\text{teste}} - DO_{\text{neg}}) / (DO_{\text{pos}} - DO_{\text{neg}}) \times 100$$

Os valores de PP das amostras foram calculados com auxílio de uma base de dados em Microsoft EXCEL, de acordo com esta fórmula.

Critérios de validação:

Os resultados obtidos apenas foram considerados válidos quando observados os seguintes critérios:

- a DO do controlo positivo não excedeu 2,0;
- a DO do controlo negativo não excedeu 0,5;
- a diferença entre os controlos positivo e negativo foi superior ou igual a 0,3.

Classificação dos soros-problema:

Os resultados individuais de cada amostra foram classificados em positivo, negativo ou duvidoso, de acordo com os critérios definidos pelo fabricante do teste e referidos pela OIE (OIE, 2004):

Valor de PP (%)	Resultado
< 30	negativo
≥ 30 até < 40	duvidoso
≥ 40	positivo

Para efeitos de detecção de seroconversão e estimativa da seroprevalência, os animais cujos soros foram classificados como duvidosos foram considerados negativos.

II.3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nos testes ELISA foram inseridos na base de dados em Microsoft EXCEL, onde já constavam os dados de cada exploração. A base de dados foi exportada para o programa SPSS for Windows 16.0, sobre a qual foi feito um tratamento estatístico,

descritivo e analítico.

Foi efectuada uma análise descritiva dos dados, de forma a caracterizar as explorações da amostra em relação às seguintes variáveis: tamanho da exploração (número total de animais), data de recolha das amostras e localização por freguesia.

II.3.3.1. Estimativa da proporção de explorações com serologia positiva

Com base nos resultados dos soros individuais obtidos pela ELISA, foram identificadas as explorações positivas e as negativas. Uma exploração é considerada positiva se nela tiver sido detectado pelo menos um animal seropositivo.

Foi calculada a proporção aparente de explorações afectadas, através da razão entre o número de explorações consideradas positivas e o total de explorações na amostra. Uma vez que a sensibilidade e especificidade do teste estão próximas dos 100%, a prevalência aparente de explorações positivas foi considerada como sendo igual à prevalência real na amostra. A partir desta, foi calculado o erro absoluto, de forma a estimar o intervalo de prevalência para a população do concelho em estudo, através da seguinte fórmula:

$$IC = p \pm \left(\sqrt{\frac{p(1-p)}{n}} \times 1,96 \right)$$

em que p é a prevalência na amostra (proporção aparente).

II.3.3.2. Explorações fortemente positivas

De forma a obviar eventuais diferenças nos níveis de seropositividade, foi adoptada uma classificação proposta pelo fabricante, validada apenas para França, segundo a qual os soros individuais positivos foram classificados como positivos ($DO \geq 40\%$ e $<80\%$) e fortemente positivos ($DO \geq 80\%$). De acordo com esta classificação, as explorações positivas onde foram detectados um ou mais animais com soros fortemente positivos foram classificados como fortemente positivas.

II.3.3.3. Estimativa de seroprevalências intra-exploração nas explorações positivas

A partir do número de animais positivos foi efectuada o cálculo da seroprevalência intra-exploração na amostra obtida a partir de cada exploração positiva. Mais uma vez, assumindo que a sensibilidade e especificidade do teste é de 100%, a prevalência real foi considerada igual à seroprevalência aparente.

Para estimar os intervalos das seroprevalências para o total da população de cada exploração, foram calculados os erros padrão em cada uma delas, através do Winepiscope 2.0.

Os valores de seroprevalência intra-exploração foram adicionados às bases de dados e foi feito um tratamento estatístico descritivo.

II.3.3.4. Estatística analítica

Uma vez identificadas as explorações positivas, procedeu-se a uma análise comparativa do grupo das explorações positivas e negativas, relativamente a variáveis como: localização por freguesia, tamanho de exploração e data de recolha das amostras de sangue. Foram determinadas as medidas de força de associação estatística para averiguar possíveis relações de causalidade (χ^2 , *Fischer's exact test*).

Foi ainda feita uma análise no grupo das explorações positivas, de forma a comparar as explorações onde foram encontrados soros fortemente positivos (DO > 80%) com aquelas onde não foram encontrados estes soros. Esta análise incidiu sobre as variáveis freguesia, data da colheita da amostra de sangue e tamanho da exploração.

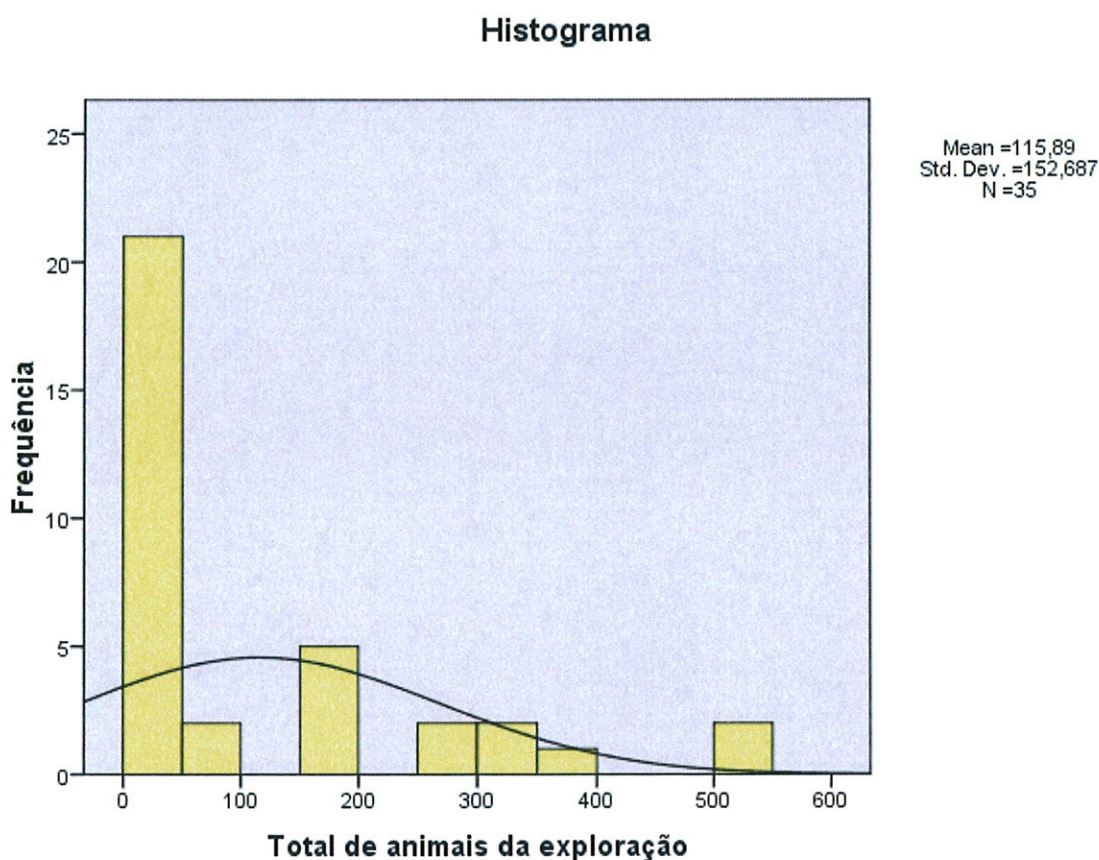
Dentro do grupo das explorações positivas foi feita uma análise comparativa das médias das seroprevalências obtidas, relativamente às mesmas variáveis, de forma a avaliar a sua variabilidade. Foi utilizado teste *Mann-Whitney*, em alternativa ao teste *t* de *student* para duas amostras independentes, uma vez que os dois grupos têm variâncias muito diferentes. Esta análise das seroprevalências foi também feita de forma a comparar as médias de seroprevalências no grupo de explorações fortemente positivas com o grupo das positivas.

II.4 RESULTADOS

II.4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS EXPLORAÇÕES

A partir das informações veiculadas pela listagem que acompanhava os soros, conjuntamente com os dados recolhidos posteriormente na OPP, foi possível fazer uma caracterização sumária das explorações incluídas no estudo.

Gráfico 1: Tamanho do efectivo das explorações pertencentes à amostra – distribuição de frequências



Esta distribuição tem um desvio em relação à distribuição normal (Coeficiente de assimetria >1).

Das explorações em estudo, 60% das explorações (n=21) tem menos de 50 animais. Os restantes 40% (n=9) distribuem-se pelas outras classes, até um valor máximo de 534 animais (exploração #169). As explorações foram, por isso, incluídas em 3 classes, de forma a agrupá-las em classes mais abrangentes (Tabela 7).

Tabela 7: Tamanho do efectivo das explorações pertencentes à amostra – análise descritiva

Classe	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)	Frequência acumulada	Frequência relativa acumulada (%)
≤50	21	60,0	21	60,0
>50; ≤300	9	25,7	30	65,7
>300	5	14,3	35	91,4
Total	35	100	35	100

Os valores obtidos por uma análise estatística descritiva efectuada sobre os dados agrupados por freguesia estão representados na Tabela 8 e na Tabela 9.

Tabela 8: Distribuição das explorações pertencentes à amostra – freguesia

Freguesia	Frequência absoluta
Bispo	6
Ciborro	1
Cortiçadas	1
Escoural	3
Lavre	5
S. Cristovão	6
N ^a S ^{ra} da Vila	13

Tabela 9: Distribuição das explorações da amostra em função do seu tamanho e da freguesia

Freguesia	Tamanho da exploração			Total
	≤50	>50; ≤300	>300	
Bispo	5	1	0	6
Ciborro	1	0	0	1
Cortiçadas	1	0	0	1
Escoural	1	1	1	3
Lavre	2	2	1	5
S. Cristóvão	6	0	0	6
Vila	5	5	3	13
Total	21	9	5	35

II.4.2. RASTREIO SEROEPIDEMIOLÓGICO – DETECÇÃO DE DOENÇA

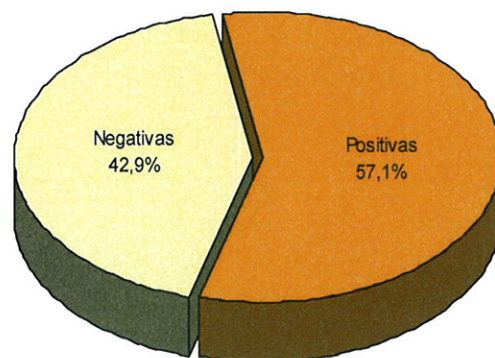
Os resultados obtidos nos testes ELISA efectuados às amostras de soro individuais permitiram identificar 20 explorações positivas e 15 negativas. Não houve nenhuma exploração com resultado inconclusivo.

Tabela 10: Classificação das explorações de acordo com os resultados de ELISA

Classificação	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Negativa	15 (35)	42,9
Positiva	20 (35)	57,1
Duvidosa	0 (35)	0

A percentagem de explorações em que foram detectados anticorpos anti-*C. burnetii*, no universo de explorações amostradas foi de 57,1%.

Gráfico 2: Proporção de explorações positivas e negativas na amostra de acordo com os resultados de ELISA aplicado aos soros individuais

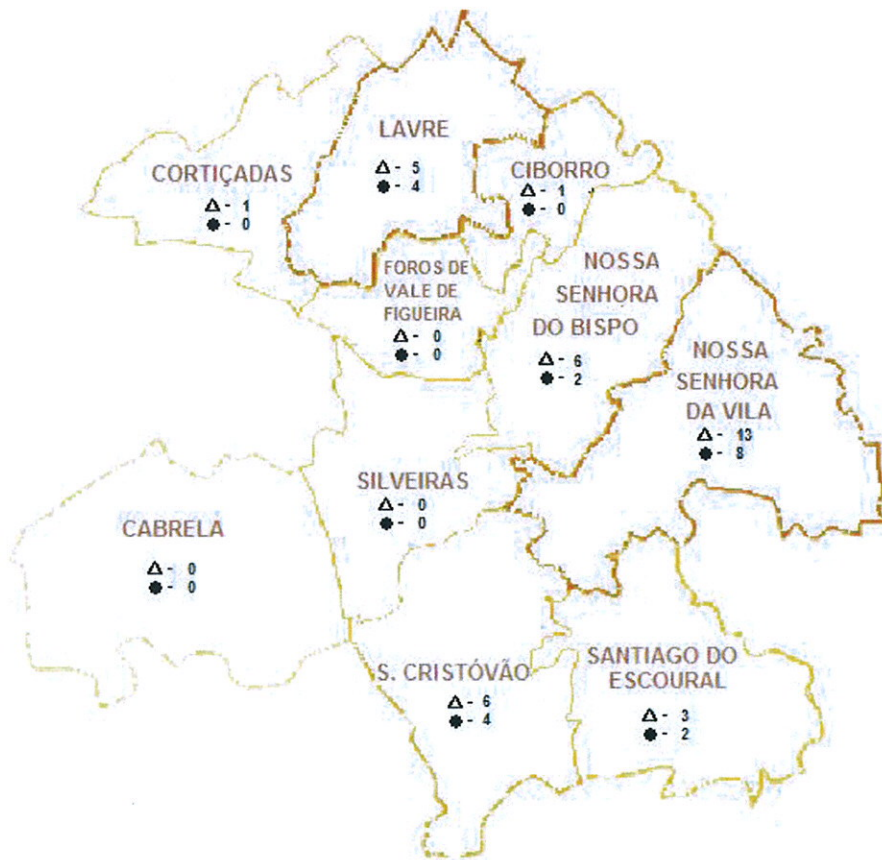


O erro absoluto para o cálculo da prevalência foi de 16,4. Deste modo, a prevalência estimada de explorações com serologia positiva para a população do concelho de Montemor-o-Novo pode variar entre 40,7% e 73,5%, para um nível de confiança de 95% e assumindo que o teste de diagnóstico tem sensibilidade e especificidade de 100%.

II.4.2.1. Distribuição por freguesia

Embora não fizesse parte dos objectivos iniciais a análise da distribuição de explorações positivas por freguesia, não tendo sido feita uma amostragem proporcional com este fim, apresenta-se, de seguida, a localização das explorações classificadas como positivas e negativas (Figura 9).

Figura 9: Distribuição das explorações testadas por freguesia



Legenda: Δ - nº de explorações testadas; ✱ - nº de explorações positivas

Em 3 freguesias (Foros de Vale de Figueira, Cabrela e Silveiras) não foi seleccionada nenhuma exploração e em 2 (Cortiçadas e Ciborro) apenas foi seleccionada uma.

A Tabela 11 apresenta as frequências absolutas das explorações positivas em cada freguesia e as proporções de explorações positivas por freguesia. O Gráfico 3 mostra também estas mesmas proporções.

Tabela 11: Distribuição das explorações por freguesia

Freguesia	n	(+)	(+)/n
Bispo	6	2	33%
Cabrela	0	-	-
Ciborro	1	0	0%
Cortiçada	1	0	0%
Escoural	3	2	67%
Lavre	5	4	80%
Foros de Vale de Figueira	0	-	-
S. Cristovão	6	4	67%
Silveiras	0	-	-
N ^a Sr ^a Vila	13	8	62%
Total:	35	20	-

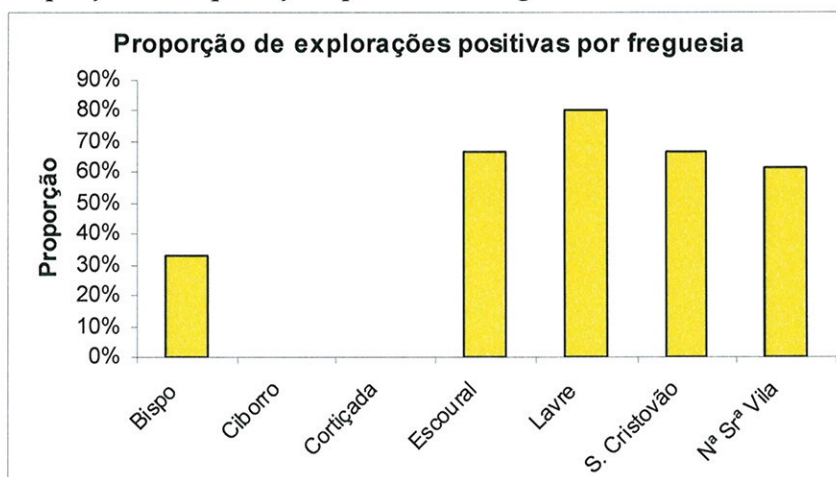
Legenda:

n – n^o de explorações seleccionadas das quais foram recolhidas amostras;

(+) – frequência absoluta de explorações classificadas como positivas em cada freguesia;

(+)/n – proporção de explorações positivas em cada freguesia.

Gráfico 3: Proporção de explorações positivas e negativas na amostra em cada freguesia



Não se observou qualquer relação estatisticamente significativa entre a positividade o facto de uma exploração pertencer a uma determinada freguesia.

II.4.2.2. Distribuição por tamanho da exploração

Como se pode ver através do Gráfico 1, a amostra é constituída por explorações com um número muito variável de animais.

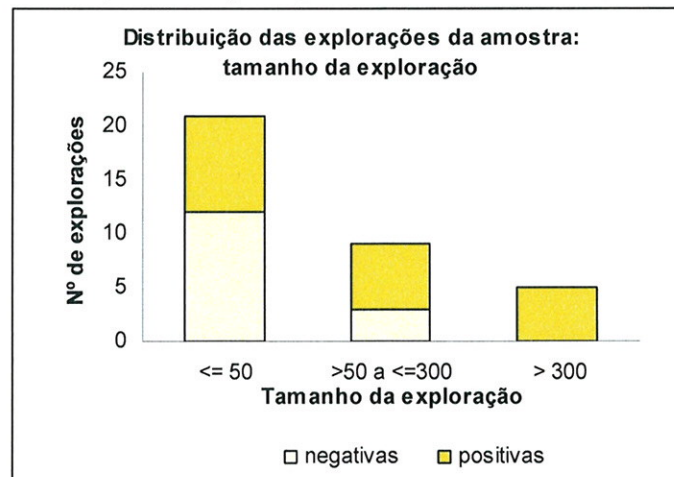
De forma a poder avaliar a eventual influência do tamanho da exploração nos resultados finais, apresenta-se, no Gráfico 4, a distribuição das explorações classificadas como positivas e negativas no universo da amostra em função do seu tamanho. Todas as explorações com um número de animais superior a 60 (n=10) são positivas.

Observamos uma relação estatisticamente significativa entre o tamanho de exploração e a classificação como positiva ou negativa ($p < 0,05$; teste de χ^2), ou seja, as explorações com mais de 50 animais têm maior probabilidade de serem positivas.

Tabela 12: Distribuição das explorações em função do tamanho da exploração

Tamanho da exploração	Classificação das explorações		
	(-)	(+)	Total
≤ 50	12	9	21
$>50; \leq 300$	3	6	9
>300	0	5	5
Total	15	20	35

Gráfico 4: Distribuição das explorações da amostra em função do seu tamanho



Para avaliar uma hipotética influência de falsos resultados positivos na classificação das explorações como positivas, foi feito o levantamento do número de explorações nas quais foi detectado apenas um soro positivo, em função do seu tamanho (Tabela 13). Foram identificadas sete explorações nestas condições, tendo três delas menos de 50 animais, duas entre 50 e 300 e duas mais de 300.

Tabela 13: Explorações com apenas um soro positivo

Nº id exploração	Nº de soros positivos na amostra	Total de animais na exploração
#60	1/32	336
#77	1/30	189
#149	1/9	9
#164	1/17	19
#168	1/29	167
#210	1/14	14

II.4.2.3. Distribuição por mês de colheita das amostras de sangue

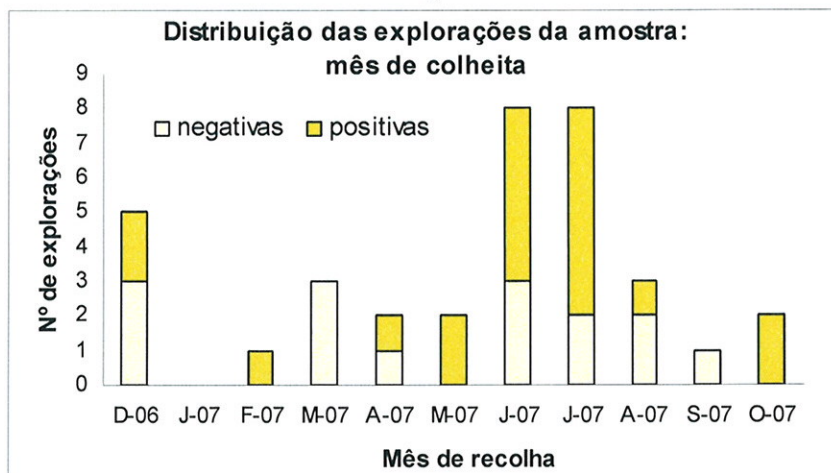
As recolhas das amostras de sangue em cada exploração foram distribuídas ao longo de um período de 10 meses, entre Dezembro de 2006 e Outubro de 2007. A distribuição das explorações classificadas como positivas e negativas relativamente ao mês de colheita da amostra de sangue é apresentada na Tabela 14.

Tabela 14: Distribuição das explorações da amostra em função da data de recolha das amostras de sangue

Mês de recolha das amostras	Explorações		
	Negativas	Positivas	Total
Dezembro 06	3	2	5
Fevereiro 07	0	1	1
Março 07	3	0	3
Abril 07	1	1	2
Mai 07	0	2	2
Junho 07	3	5	8
Julho 07	2	6	8
Agosto 07	2	1	3
Setembro 07	1	0	1
Outubro 07	0	2	2
Total	15	20	35

O Gráfico 5 mostra também a distribuição das explorações positivas e negativas, pondo em evidência a proporção de explorações positivas relativamente ao mês em que foram recolhidas as amostras de sangue. As recolhas das amostras de sangue não foram uniformes ao longo do ano. Há um maior número de colheitas nos meses de Junho e Julho e nenhuma feita em Janeiro.

Gráfico 5: Distribuição das explorações em função da data de recolha das amostras de sangue



O facto de uma exploração ser classificada como positiva ou negativa não está relacionado com o mês de colheita ($p > 0,05$; teste do χ^2).

II.4.2.4. Explorações fortemente positivas

As frequências relativas e absolutas após reclassificação das explorações positivas em explorações fortemente positivas e positivas, segundo o critério de % de DO (positivas: $DO \geq 40\%$ e $< 80\%$; fortemente positivas: $DO \geq 80\%$), são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Reclassificação das explorações

Classificação	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Negativa	15 (35)	42,9
Positiva	10 (35)	28,55
Fortemente positiva	10 (35)	28,55

Metade ($n=10$) das 20 explorações anteriormente classificadas como positivas têm, pelo menos 1 animal fortemente positivo.

Seguidamente apresenta-se a distribuição das explorações reclassificadas como positivas e fortemente positivas de acordo com a freguesia a que pertencem (Tabela 16), o tamanho da exploração (Tabela 17) e o mês de recolha das amostras de sangue (Tabela 18).

Estes dados dizem respeito apenas ao universo das explorações positivas, tendo sido omitidas as negativas.

Tabela 16: Distribuição das explorações positivas em função da freguesia

Freguesia	Classificação das explorações positivas		
	(+)	(++)	Total
Bispo	0	2	2
Ciborro	0	0	0
Cortiçadas	0	0	0
Escoural	1	1	2
Lavre	3	1	4
S. Cristóvão	2	2	4
Vila	4	4	8
Total	10	10	20

Tabela 17: Distribuição das explorações positivas em função do tamanho da exploração

Tamanho da exploração	Classificação das explorações positivas		
	(+)	(++)	Total
≤50	4	5	9
>50; ≤300	2	4	6
>300	4	1	5
Total	10	10	20

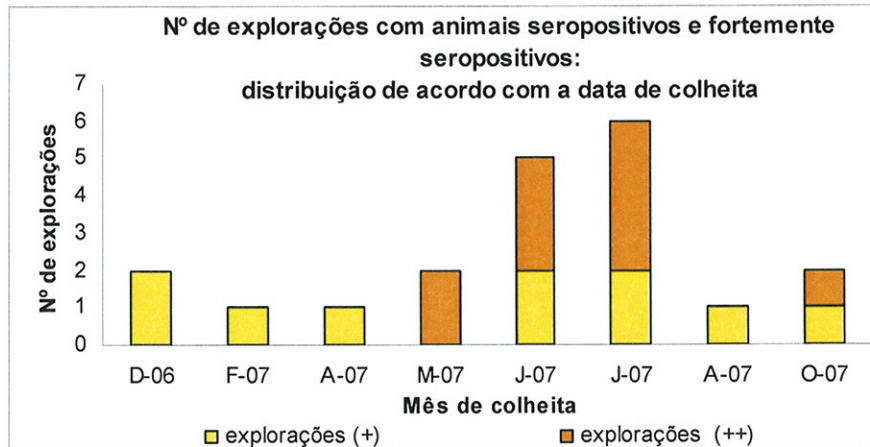
Tabela 18: Distribuição das explorações positivas em função do mês de recolha

Classificação das explorações positivas	Mês de recolha das amostras								Total
	Dez 06	Fev 07	Abr 07	Mai 07	Jun 07	Jul 07	Ago 07	Out 07	
(+)	20 % (2/10)	10% (1/10)	10% (1/10)	0% 0	20% (2/10)	20% (2/10)	10% (1/10)	10% (1/10)	10
(++)	0% 0	0% 0	0% 0	20% (2/10)	30% (3/10)	40% (4/10)	0% 0	10% (1/10)	10
Total	10% (1/20)	10% (2/20)	5% (1/20)	20% (2/20)	25% (5/20)	30% (6/20)	5% (1/20)	20% (2/20)	20

Como as recolhas não foram efectuadas de modo uniforme ao longo dos meses, as proporções de explorações positivas e fortemente positivas amostradas em cada mês são apresentadas no Gráfico 6. Verifica-se que as explorações com animais fortemente positivos

foram recolhidas nos meses de Maio (2/2), Junho (2/5), Julho (4/6) e Outubro (1/2), ou seja, 100% das explorações positivas recolhidas em Maio correspondem a explorações com serologia elevada, 40% das recolhidas em Junho, 67% das recolhidas em Julho e 50% das recolhidas em Outubro.

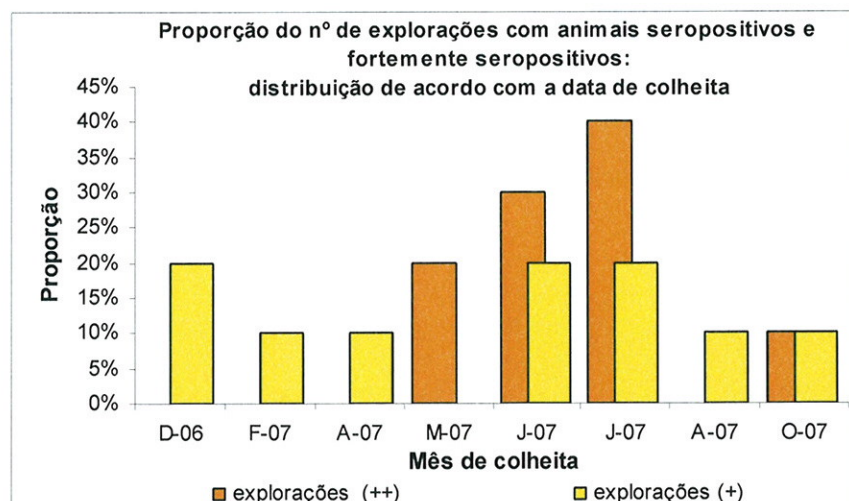
Gráfico 6: Distribuição das explorações positivas por mês de recolha das amostras



Analisando os dados agrupadamente, vemos que, das 13 recolhas efectuadas entre os meses de Maio e Julho, 69% (n=9) correspondem a explorações com animais com respostas serológicas elevadas. Nos restantes meses de recolha (Dezembro, Fevereiro, Agosto e Outubro) foram efectuadas 7 recolhas em explorações positivas, das quais apenas 1 (14%) foi classificada como fortemente positiva.

No Gráfico 7 podemos ver a distribuição de explorações positivas e fortemente positivas de acordo com o mês de colheita das amostras de sangue, expressas em termos de percentagem do total de explorações positivas e fortemente positivas, respectivamente.

Gráfico 7: Distribuição das explorações positivas por mês de recolha das amostras

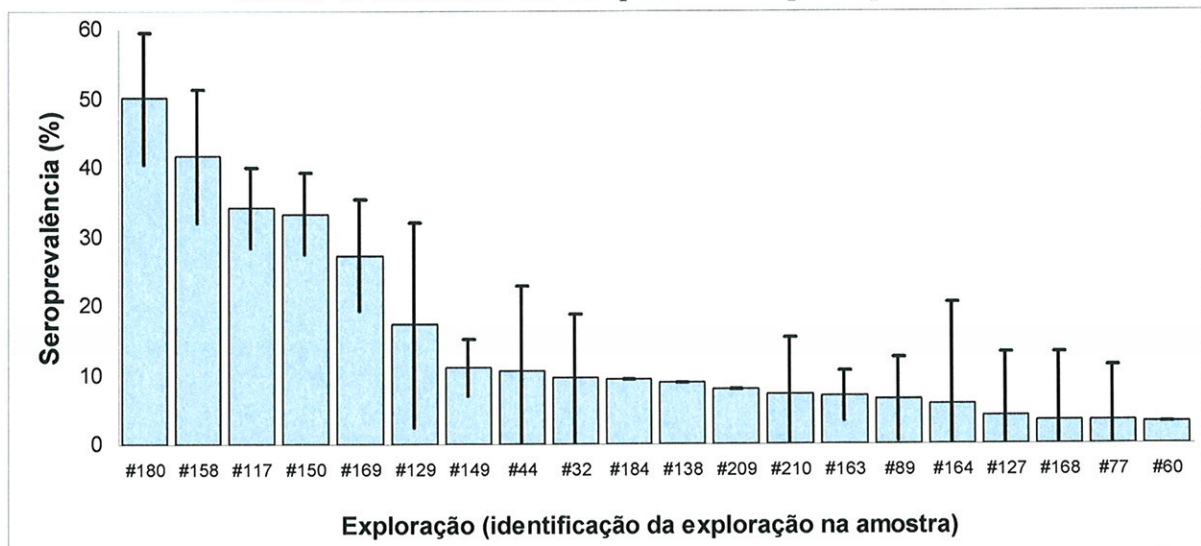


Foi encontrada uma relação entre a existência destas explorações com animais fortemente positivos e o facto de as amostras de sangue terem sido recolhidas nos meses de Maio, Junho e Julho ($p < 0,05$, *Fisher Exact Test*).

II.4.3. ESTUDO DESCRITIVO – ESTIMATIVA DE DOENÇA

As seroprevalências intra-exploração, no grupo de animais seleccionados em cada exploração, variaram entre 3,1% e 50,0% (Gráfico 8).

Gráfico 8: Estimativa das seroprevalências por exploração



A Tabela 19 mostra as frequências absolutas (número de animais positivos) e relativas (proporção de seropositividade) na amostra recolhida em cada exploração, bem como os valores corrigidos para o universo da exploração, tendo em conta o erro absoluto.

Tabela 19: Seropositividade nas explorações positivas

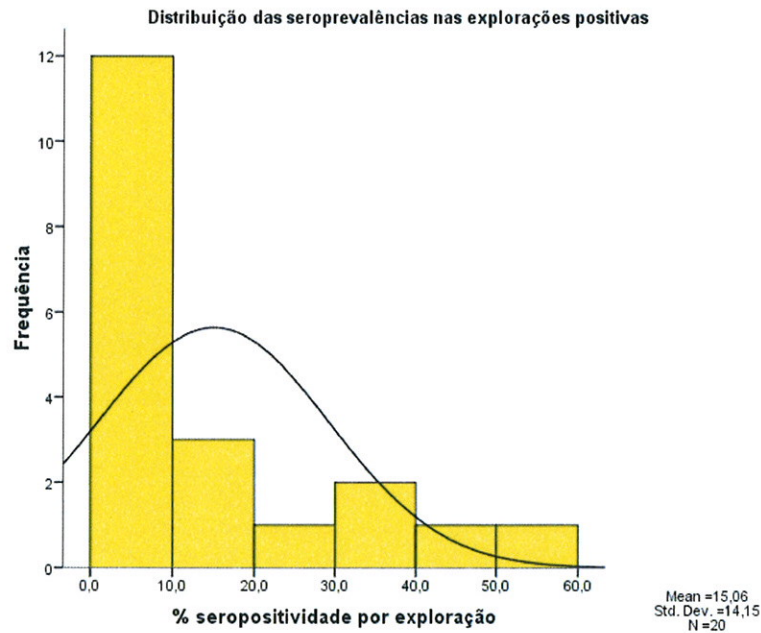
Nº id exploração	Nº de soros positivos na amostra	Proporção de seropositividade na amostra (%)	Total de animais na exploração	Intervalo de confiança (%)
#32	2/21	9,5	48	[0,1 - 18,9]
#44	2/19	10,5	37	[0,9 - 20,2]
#60	1/32	3,1	336]0 - 8,9]
#77	1/30	3,3	189]0 - 9,2]
#89	2/31	6,5	259]0 - 14,6]
#117	12/35	34,3	298	[19,5 - 49,1]
#127	1/25	4,0	35]0 - 8,1]
#129	5/29	17,2	162	[4,8 - 29,7]
#138	3/34	8,8	533]0 - 18,0]
#149	1/9	11,1	9	-
#150	4/12	33,3	12	-
#158	5/12	41,7	12	-
#163	2/29	6,9	150]0 - 15,2]
#164	1/17	5,9	19	[2,3 - 9,5]
#168	1/29	3,4	167]0 - 9,5]
#169	9/33	27,3	534	[12,6 - 42,0]
#180	5/10	50,0	11	[40,7 - 59,3]
#184	3/32	9,4	399]0 - 19,1]
#209	3/38	7,9	320]0 - 15,9]
#210	1/14	7,1	14	-
Total	64/726	8,8	3530	[6,9 - 10,7]

A prevalência de soros individuais positivos no total das explorações seleccionadas no concelho de Montemor-o-Novo foi de 8,8% (IC: 6,9% - 10,7%), para um nível de confiança de 95%.

II.4.3.1. Caracterização da distribuição de seroprevalências intra-exploração

A análise estatística dos resultados de seroprevalência obtidos nas explorações positivas revela uma variabilidade elevada. A distribuição de frequências está apresentada no Gráfico 9.

Gráfico 9: Seroprevalências por exploração – distribuição de frequências



Esta distribuição tem um desvio em relação à distribuição normal (Coeficiente de assimetria >1).

Os valores da análise estatística estão apresentados na Tabela 20 e no Gráfico 10.

Gráfico 10: Seroprevalências por exploração – análise estatística descritiva

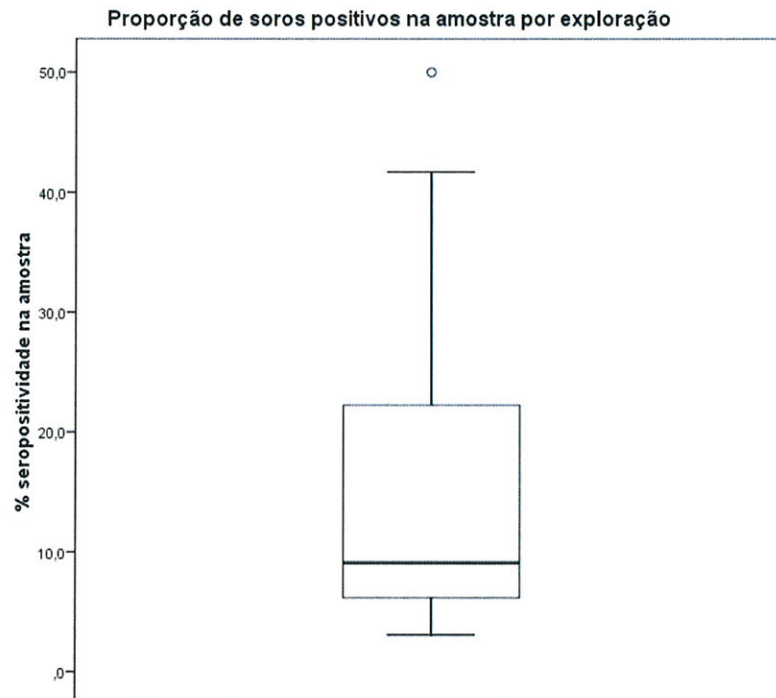


Tabela 20: Seroprevalências por exploração – análise estatística descritiva

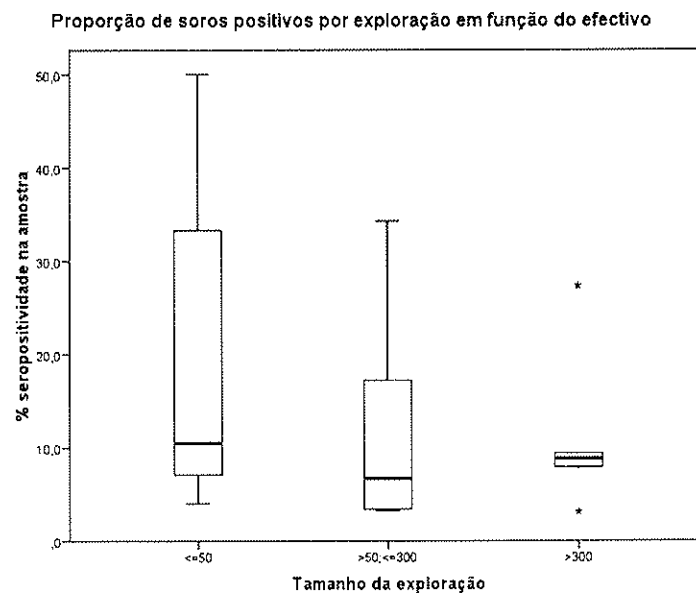
Média	15,1
Mediana	9,1
Desvio padrão	14,2
Mínimo	3,1
Máximo	50,0

A média de seroprevalências intra-exploração é de 15,1%, mas o desvio padrão é de 14,2.

A análise estatística dos dados agrupados de acordo com as variáveis tamanho da exploração (Gráfico 11), mês de colheita (Gráfico 12) e grau de seropositividade (Gráfico 14) também seguem esta tendência de variabilidade.

Tamanho de exploração

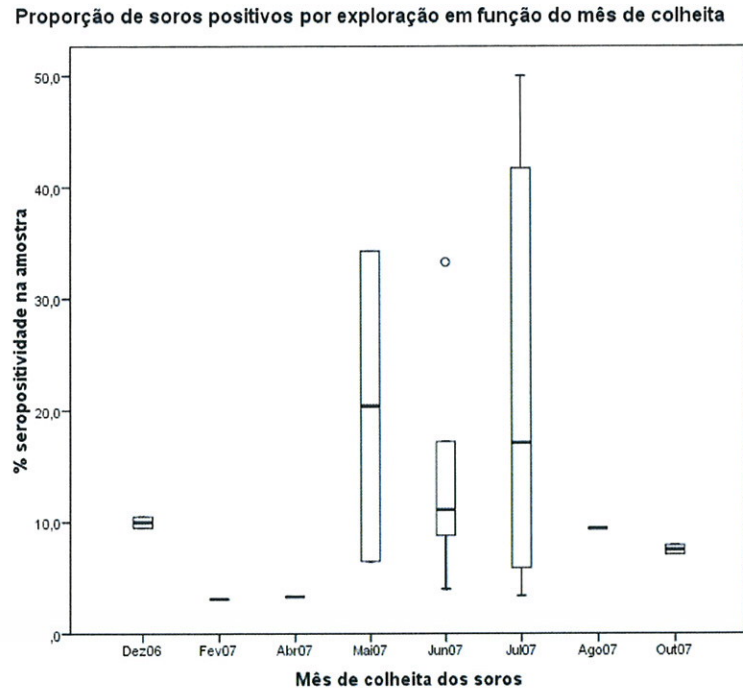
Gráfico 11: Seroprevalências por exploração – análise estatística descritiva agrupada em função do tamanho de exploração



A seroprevalência não varia com o tamanho de exploração, mesmo quando se consideram dois grupos: explorações até 50 animais e explorações com mais de 50 animais ($p > 0,05$; teste *Mann-Whitney*).

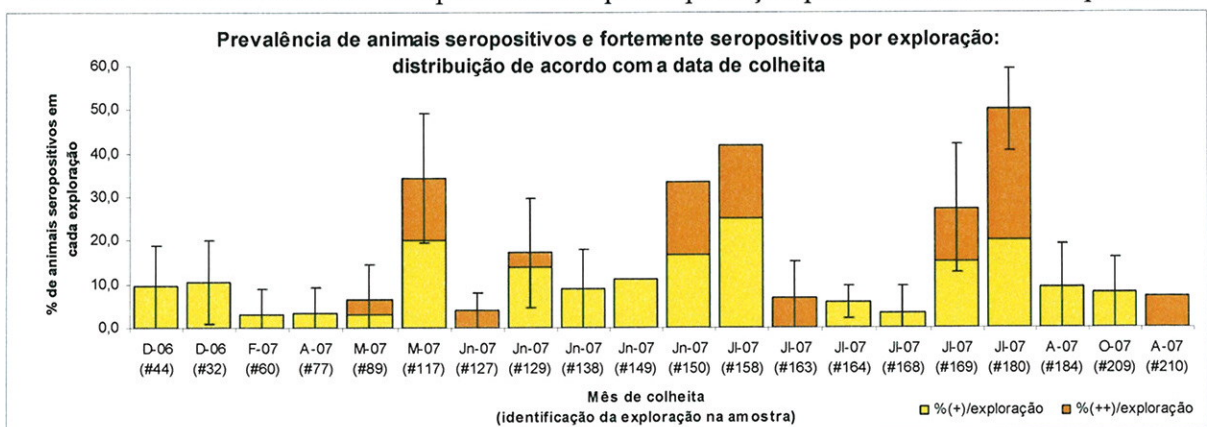
Mês de recolha das amostras

Gráfico 12: Seroprevalências por exploração – análise estatística descritiva agrupada em função do mês de colheita das amostras



A seroprevalência varia com o mês de recolha das amostras de sangue nas explorações. Há significância estatística quando se consideram dois grupos: os meses de Maio, Junho e Julho agrupados, comparativamente aos outros meses ($p < 0,05$; teste *Mann-Whitney*).

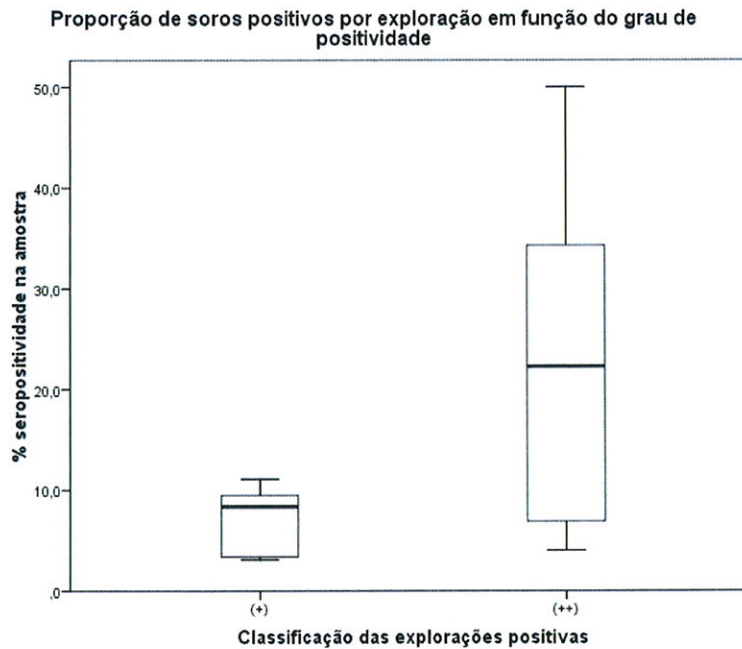
Gráfico 13: Estimativa das seroprevalências por exploração positiva e fortemente positiva



Legenda: (+) exploração com soros positivos; (++) exploração com pelo menos 1 soro fortemente positivo

Grau de seropositividade

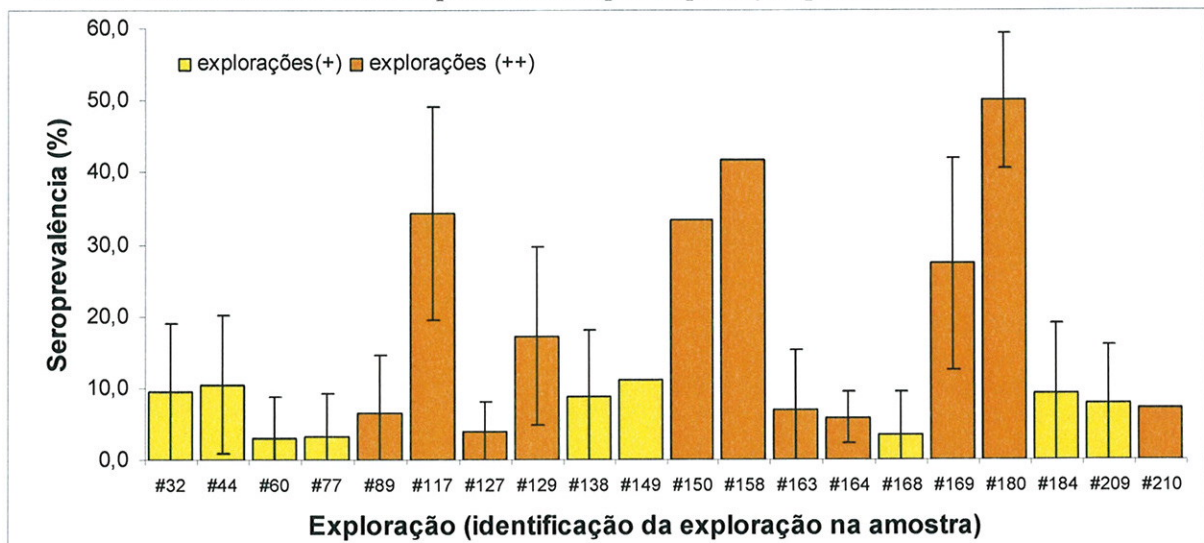
Gráfico 14: Seroprevalências por exploração – análise estatística descritiva agrupada em função do grau de seropositividade



As explorações fortemente positivas têm maior seroprevalência ($p < 0,05$; teste *Mann-Whitney*).

Nem todas as explorações que têm animais fortemente positivos apresentam valores de seroprevalências elevados, enquanto que todas as que tem seroprevalências elevadas são fortemente positivas (Gráfico 15).

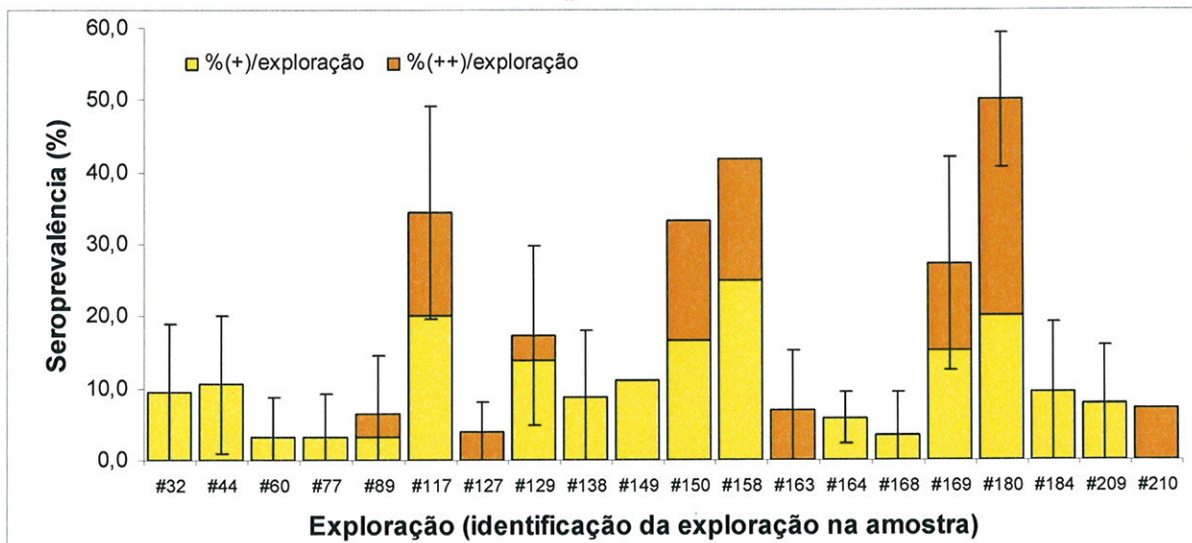
Gráfico 15: Estimativa das seroprevalências por exploração positiva e fortemente positiva



Legenda: (+) exploração com soros positivos; (++) exploração com pelo menos 1 soro fortemente positivo

Todas as explorações com seroprevalências superiores a 10% (n=6) têm animais com serologia elevada. Destas, aquelas que têm prevalências mais altas, têm maior proporção de soros fortemente positivos (Gráfico 16).

Gráfico 16: Estimativa da proporção de soros positivos e fortemente positivos em cada exploração



Legenda: (+) soros positivos; (++) soros fortemente positivos;

II.5 DISCUSSÃO

A Febre Q, sendo uma zoonose presente em quase todo o Mundo (Maurin e Raoult, 1999), é ainda pouco conhecida em Portugal. Os estudos epidemiológicos e a investigação de surtos publicados nos últimos anos em vários países mostram que a doença deve ser considerada um problema de saúde pública crescente (Arricau-Bouvery e Rodolakis, 2005).

Em Portugal, os casos Humanos reportados à Direcção Geral de Saúde (DGS, 2006) indicam a existência de *C. burnetii*, mas são escassos os dados relativos à sua presença nas espécies animais. Sabendo que são os animais domésticos, particularmente os ruminantes, a fonte de infecção para o Homem (Maurin e Raoult, 1999), é fundamental o conhecimento da prevalência do agente nestas espécies. Por este motivo foi realizado um rastreio serológico em amostras individuais de soros de ovinos, na região do Alentejo, onde está relatada a existência de casos humanos de Febre Q (DGS, 2006). A seroprevalência foi determinada por ELISA, um método fácil e rápido de executar e que é uma das principais técnicas aplicadas na monitorização de explorações, em larga escala e numa base de rotina (Arricau-Bouvery *et al.*, 2003; Masala *et al.*, 2004; Manteca, 2005; Çekani *et al.*, 2008).

Foi escolhida a espécie ovina por existirem evidências de ser esta a fonte de infecção mais provável para o Homem, tendo sido responsável pela ocorrência de surtos da doença, nos últimos anos, em alguns países da Europa (Arricau-Bouvery e Radolakis, 2005; Manteca, 2005). Os ovinos são também importantes nos países da bacia mediterrânica, nomeadamente em Portugal, no que se refere ao tamanho do efectivo. Os resultados obtidos no estudo efectuado revelaram a presença de animais com serologia positiva para *C. burnetii*, o que permite concluir que estiveram, em algum período da sua vida, em contacto com o agente etiológico da Febre Q, apontando para uma possível circulação deste no concelho de Montemor-o-Novo. Estes dados confirmam as expectativas iniciais e são corroborados pela existência de casos de Febre Q no Homem nesta região.

Este é, de acordo com a pesquisa bibliográfica efectuada, o primeiro estudo epidemiológico realizado em Portugal para detecção de anticorpos anti-*C. burnetii* em ovinos. Anteriormente, o estudo de Bacellar *et al.* (1995) realizado em cães do concelho de Setúbal tinha também indicado a circulação de *C. burnetii* em Portugal, na região Sul.

Nas 35 explorações amostradas, foi observada uma proporção de 57,1% (IC: 40,7% - 73,5%) com pelo menos um animal positivo (n=20), para um nível de confiança de 95%. Este foi considerado como o valor de prevalência real, assumindo valores de especificidade

e sensibilidade de 100%, conforme indicado pelo fabricante do teste ELISA utilizado. Para calcular de forma precisa a prevalência real na amostra, será necessário determinar os valores de sensibilidade e especificidade individuais do teste, para extrapolar os valores agregados para a exploração e, assim, reduzir o impacto de possíveis explorações falsamente classificadas como positivas.

Nas 20 explorações positivas, foi feita uma estimativa de doença através do cálculo da seroprevalência intra-exploração, a qual variou entre 3% e 50%. A seroprevalência individual, no total das 726 amostras, foi de 8,8%.

Na ausência de dados relativos à situação epidemiológica em Portugal, analisam-se as prevalências encontradas em vários estudos efectuados em outros países, onde a situação epidemiológica da doença é mais bem conhecida.

A análise da seroprevalência de 9349 soros de ovinos e caprinos, na Sardenha, entre 1999 e 2002 (Masala *et al.*, 2004), indicou uma distribuição de *C. burnetii* elevada nestas espécies (47% de explorações de ovinos e 38% de caprinos com serologia positiva). Foram consideradas como positivas as explorações com mais do que um animal seropositivo. Aplicando os mesmos critérios ao estudo efectuado em Montemor-o-Novo, ou seja, quando são consideradas como positivas as explorações com pelo menos dois soros positivos, obtêm-se 37% de explorações positivas na amostra (13/35).

Este estudo (Masala *et al.*, 2004) foi feito em explorações nas quais ocorreram abortos e as amostras foram recolhidas na época de parto, enquanto que o estudo efectuado em Montemor-o-Novo foi feito em animais cujo perfil sanitário relativamente à ocorrência de problemas de fertilidade é desconhecido, o que pode justificar a existência de seroprevalência mais elevada na Sardenha. No entanto, não foi apresentado um grupo controlo, cujas amostras tenham sido recolhidas fora da época de partos, o que seria interessante para comparar com os resultados obtidos em Montemor-o-Novo, onde se observa uma diferença significativa no número de explorações fortemente positivas nas quais as amostras foram recolhidas nos meses posteriores às épocas de parto mais comuns no Alentejo.

Na Turquia (Cetinkaya *et al.*, 2000), em 1998, foram recolhidos soros de 411 ovinos pertencentes a 47 explorações e analisadas pelo teste de IFA. Foi observada seroconversão (existência de pelo menos um animal positivo) em 44,7% das explorações, correspondendo a uma percentagem de 10,5 % das amostras individuais. Um estudo realizado no Chade,

entre 1999 e 2000 (Schelling *et al.*, 2003), também revelou valores semelhantes (43% de explorações positivas e 11% de soros individuais positivos). Na Albânia, a prevalência de anticorpos anti-*C. burnetii* em soros de 1085 ovinos e caprinos, analisados pela técnica ELISA, foi de 9,8% (Çekani *et al.*, 2008).

Num estudo realizado por Manteca (2005), em França, usando o mesmo teste ELISA que foi utilizado no estudo efectuado em Montemor-o-Novo, em 260 adultos ovinos, pertencentes a 26 explorações, foram encontradas 10 explorações com resultados positivos (38%), 3 duvidosas e 13 negativas (50%). A prevalência individual foi de 4%. Nas explorações positivas a seroprevalência atinge 16%.

Estes estudos apresentam resultados semelhantes na espécie ovina, em diferentes países. Em França, por outro lado, os diferentes trabalhos publicados indicam uma grande variabilidade nos resultados de seroprevalência no efectivo ovino nacional, a qual varia entre 0 a 20%, enquanto que a prevalência de rebanhos pode variar entre 0 a 89 % (AFSSA, 2004). Esta grande variabilidade de seroprevalência entre diferentes estudos conduzidos num mesmo país foi igualmente reportada no Japão (Harai e To, 1998).

Segundo o painel de peritos da *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments* (AFSSA) para a avaliação do risco de Febre Q para a Saúde Pública (AFSSA, 2004), entre as diversas razões que explicam esta variabilidade, destacam-se a falta de técnicas serológicas padronizadas, a qualidade da amostragem, a sua representatividade ou a interpretação que dela é feita.

Por outro lado, o facto de as amostras serem recolhidas nos casos de declaração de abortos, como no estudo de Masala *et al.* (2004) pode conduzir a sobre-estimativa da seroprevalência quando esta é extrapolada à totalidade do efectivo.

Os resultados podem também variar com a distribuição geográfica das explorações onde são recolhidas as amostras. Um inquérito conduzido em França entre 1982 e 1984, por uma mesma equipa, mostra uma percentagem de explorações de ovinos com pelo menos um animal com serologia positiva que varia entre 0 e 80 % em diferentes regiões ao longo de um mesmo ano (citado em AFSSA, 2004).

Quando analisamos os resultados obtidos relativamente à distribuição geográfica no estudo efectuado em Montemor-o-Novo, não se observa qualquer diferença estatisticamente significativa que correlacione a distribuição de explorações positivas por freguesia, como no caso de um estudo efectuado no Canadá (Lang *et al.*, 1991), em que as explorações positivas

se encontravam muito próximas umas das outras e agrupadas por regiões. Teria sido interessante incluir animais de outros concelhos ou regiões para verificar se há diferenças geográficas significativas e assim identificar o seu papel na epidemiologia da doença em Portugal. Teria também sido útil georeferenciar as explorações amostradas, de forma a avaliar se existe alguma correlação entre a presença de explorações com animais positivos e características geográficas.

Outro factor a considerar é o sistema de produção praticado em cada exploração, nomeadamente no que se refere ao pastoreio ao ar livre. Os resultados obtidos por Capuano *et al.* (2001) em bovinos em Itália indicam maiores seroprevalências nos casos em que os animais estão em confinamento, o que pode ser justificado pelo facto de haver maior contacto entre os animais, potenciando a transmissão de aerossóis infectados provenientes dos materiais de parto. Pelo contrário, Lang *et al.* (1991) associaram a presença de explorações fortemente positivas a técnicas de manejo sem confinamento na época de parto, assumindo que a exposição dos ovinos a *C. burnetii* ocorre preferencialmente em meio exterior e que a presença de animais seropositivos ocorre preferencialmente em explorações com semi-confinamento ou sem confinamento.

Estes dados indicam que, nos casos em que os animais estão em confinamento, serão de esperar seroprevalências mais elevadas intra-exploração devido ao contacto mais próximo entre animais, mas que nos casos em que os animais estão em sistemas de extensivo, serão de esperar proporções mais elevadas de explorações positivas. Assim, pode atribuir-se um maior risco de uma exploração ser positiva nos casos em que os animais estejam ao ar livre, uma vez que os aerossóis podem ser transportados pelo vento entre explorações vizinhas (Tissot-Dupont *et al.*, 1999; 2004).

No estudo efectuado em Montemor-o-Novo não existem dados relativos a esta variável, mas seria interessante estudá-la como factor de risco. Apesar disso, nesta região, o sistema extensivo é o mais praticado, o que pode explicar a proporção de explorações positivas encontradas.

No estudo de Lang *et al.* (1991), em que foi utilizada a técnica ELISA, apenas 20% das explorações tiveram resultados positivos. Cerca de 50% das explorações da amostra estavam em confinamento ou semi-confinamento, o que pode justificar este valores mais baixos comparativamente ao estudo de Montemor-o-Novo, onde se supõe que não existe confinamento. Também os resultados de Masala *et al.* (2004) poderão confirmar este aspecto, uma vez que a população de ovinos deste estudo efectuado na Sardenha

corresponde a sistemas de manejo extensivo.

No estudo de Çekani *et al.* (2008) na Albânia, foram encontradas seroprevalências individuais de 9,8% em ovinos e caprinos. Também neste caso se pratica o sistema de manejo extensivo. Neste estudo não foram indicadas as proporções de explorações positivas. Contudo, o valor de seroprevalência individual é semelhante ao que foi obtido em ovinos em Montemor-o-Novo (8,8%) e na Sardenha (9%) (Masala *et al.*, 2004).

O estudo realizado no Chade, entre 1999 e 2000 (Schelling *et al.*, 2003), também revelou valores semelhantes, ou seja, 43% de explorações positivas e 11% de soros individuais positivos, onde, apesar das diferenças geográficas, o manejo também se pratica em extensivo. Neste caso também não são indicadas as datas de recolha, o que seria interessante para avaliar o impacto das épocas de parto nos resultados de serologia, uma vez que os diferentes resultados podem corresponder a variações de incidência da doença ou da intensidade da resposta imunitária que podem, por exemplo, ser em função da estação do ano. Yanase *et al.* (1997) mostraram, em vacas seguidas por um período de dois anos, que o título de anticorpos e o número de bovinos seropositivos era mais elevado no Inverno.

O mês de recolha das amostras parece ter influência nos resultados do rastreio serológico levado a cabo em Montemor-o-Novo, uma vez que foi encontrada uma relação estatisticamente significativa entre a existência de explorações com animais com serologia fortemente positiva e o facto de a recolha das amostras de sangue ter sido realizada nos meses de Maio, Junho e Julho. Esta relação com a data de recolha apenas se observa quando se comparam as explorações fortemente positivas com as positivas, não sendo significativa quando se comparam as explorações positivas com as negativas.

A seroprevalência também varia com o mês de recolha das amostras de sangue nas explorações, existindo uma maior seropositividade intra-exploração na época de final de Primavera e início do Verão, o que revela o carácter sazonal da doença, sugerindo a existência de animais com infecções crónicas ao longo de todo o ano, os quais podem ser portadores e excretar a bactéria. Uma vez que a excreção é mais elevada nas épocas de parto (To *et al.*, 1995; Hatchette *et al.*, 2001; Arricau-Bouvery *et al.*, 2003; Masala *et al.*, 2004), a probabilidade de um animal ficar infectado é proporcionalmente maior nos meses que se lhe seguem, devido a uma maior concentração no meio ambiente. Desta forma, a ocorrência de infecções agudas pode estar relacionada com uma possível concentração de partos na Primavera. No entanto, esta conclusão será apenas presumptiva, uma vez que não foram recolhidos dados detalhados dos meses de parto em cada exploração da amostra, pelo que

será necessário investigar quais são as épocas de parto nas explorações amostradas.

A eventual relação com a maior circulação de carraças nesta época do ano deve ser averiguada nas explorações em estudo, podendo também justificar a sazonalidade observada, uma vez que estas são reservatórios e vectores de *C. burnetii*. O seu potencial impacto na transmissão deste agente aos ovinos foi sugerido por Çetinkaya *et al.* (2000), tendo registado uma seroprevalência ligeiramente mais elevada nas explorações em que não havia controlo de carraças, embora esta diferença não fosse estatisticamente significativa.

No geral, não existem dados relativos a inquéritos nacionais com métodos suficientemente rigorosos, no que diz respeito a amostragem e técnica, para poder estimar correctamente as prevalências de Febre Q em animais. Existem apenas dados dispersos para os ruminantes domésticos, os quais traduzem, não só diferenças geográficas e cronológicas, mas também metodológicas. Seria, portanto falacioso tentar estabelecer comparações ou agregar os resultados obtidos nestas condições tão diferentes.

A seroprevalência da Febre Q em ovinos não pode, por isso, ser avaliada com precisão a partir da literatura. Esta avaliação, já sujeita a várias imprecisões ao nível individual para um dado rebanho, sê-lo-á muito mais para um efectivo nacional, tendo em conta a distribuição geográfica e temporal muito irregular da doença. Ainda assim, é razoável afirmar que a Febre Q é uma infecção bastante disseminada nos ovinos em diferentes países e que existe uma percentagem elevada de rebanhos que estão ou estiveram infectados.

Um outro aspecto a ter em conta na avaliação dos resultados obtidos é o facto de a resposta serológica a *C. burnetii* a nível individual nem sempre ser significativa, pelo que a serologia positiva não é totalmente representativa da manifestação da doença nas explorações, nem do estatuto de portador/excretor dos animais.

Globalmente, as dificuldades de interpretação da serologia estão ligadas sobretudo à falta de conhecimento dos perfis serológicos, período de incubação, cinética e persistência de anticorpos dos ruminantes. Por outro lado, um animal seropositivo não é forçosamente excretor e certos animais são excretores mesmo quando o nível de anticorpos anti-*C. burnetii* no seu soro é baixo (Adesiyun *et al.*, 1985; Muramatsu *et al.*, 1997; Berri *et al.*, 2001). Num estudo recente, em que foi utilizado o mesmo teste ELISA que no presente estudo, em duas explorações de ovinos fortemente infectadas, apenas 10% das fêmeas que excretavam o agente e que eram PCR positivas apresentavam serologia positiva e, numa terceira, este valor atingiu os 50% (Rodolakis *et al.*, 2007).

Assim, os resultados serológicos positivos obtidos no estudo apenas permitem concluir que estes animais estiveram em contacto com o agente da Febre Q, uma vez que a técnica serológica isoladamente não permite concluir se uma infecção é recente ou antiga, latente ou clínica, ou ainda distinguir os anticorpos vacinais dos anticorpos infecciosos. O teste ELISA utilizado detecta anticorpos anti-fase I e anti-fase II, mas não faz a discriminação entre ambos. Em caprinos foi demonstrado que após um surto de Febre Q os anticorpos anti-fase I se mantiveram em níveis elevados, enquanto que os anti-fase II diminuíram (Hatchette *et al.*, 2002), pelo que a presença de anticorpos anti-fase II poderia ser indicadora de uma infecção recente.

Outro aspecto que merece reflexão é a existência de animais com níveis elevados de anticorpos anti-*C.burnetii*, classificados como fortemente positivos, em 50% das explorações positivas (10 em 20), nas quais se observa também seroprevalência intra-exploração significativamente mais elevada. Este aspecto pode indicar que o agente está em circulação nestas explorações, podendo mesmo existir manifestações clínicas, uma vez que, à escala do rebanho, uma seroprevalência elevada e uma forte proporção de títulos elevados foram associados a rebanhos onde ocorrem abortos por Febre Q (Sanford *et al.*, 1994; Rousset *et al.*, 2007). A correlação entre prevalência da infecção por *C. burnetii* e a ocorrência de abortos na exploração foi também referida por Çetinkaya *et al.*, (2000), tendo sido observada seroprevalência significativamente mais elevada nas explorações com histórico de abortos.

Estes dados devem, contudo, ser analisados com precaução enquanto não forem feitos estudos clínicos nas explorações e aplicadas técnicas de detecção do agente, tais como o PCR. Por isso, em futuros estudos, um aspecto a abordar será a existência de potenciais problemas de fertilidade, principalmente abortos e, nos casos em que estes sejam observados, proceder a diagnóstico diferencial para determinar o possível papel de *C. burnetii* como agente etiológico. Seria interessante também averiguar se os soros fortemente positivos pertencem a fêmeas que abortam e comparar taxas de aborto nas explorações fortemente positivas e nas positivas com títulos de anticorpos normais.

Da mesma forma, assumindo que existem infecções agudas nas explorações onde são observadas seroprevalências elevadas, seria igualmente relevante conhecer a proporção de animais jovens, ou recentemente introduzidos no rebanho, para poder estimar importância destes possíveis factores de risco para a ocorrência de Febre Q, à semelhança do que foi feito por outros autores. Num primeiro estudo (Lang *et al.*, 1991), foi associada uma taxa

III.1 OBJECTIVOS

Este último capítulo tem como objectivo principal discutir a importância da Febre Q em saúde pública, com recurso aos dados disponíveis sobre a doença no Homem em Portugal e através de uma revisão bibliográfica de casos documentados em outros países.

III.2 METODOLOGIA

Foi feita uma recolha de dados disponíveis relativos à ocorrência da doença no Homem, com recurso aos dados reportados à DGS (DGS, 2006).

Uma vez que, também nesta área, os dados são limitados e a origem da doença ou as possíveis vias de contacto com o agente são difíceis de determinar em Portugal, como estudo complementar, foi feito um levantamento bibliográfico exaustivo sobre as principais fontes de contágio de Humanos com o agente da Febre Q, através da análise de surtos ocorridos em diversos países.

reduzida de reposição de ovelhas na exploração a uma probabilidade diminuída de os animais serem seropositivos e, no segundo (Capuano *et al.*, 2004), explorações com vacas e ovelhas com idades compreendidas maioritariamente entre três e cinco anos apresentavam maior prevalência do que em explorações onde a média de idades era mais baixa. Em ambos os estudos não são referidos os níveis de seropositividade individuais, pelo que não é possível concluir sobre o impacto da idade e taxa de reposição na ocorrência de infecções recentes.

Não é possível identificar animais portadores/excretores e avaliar o risco de excreção ou de transmissão a um outro rebanho ou ao Homem apenas com o método serológico. Para identificar a presença do agente no animal e pôr em evidência a excreção de *C. burnetii* deverão ser utilizadas técnicas bacteriológicas. As técnicas de amplificação genómica por PCR podem confirmar um diagnóstico directo. São mais rápidas e mais sensíveis que o isolamento e são, também, mais precoces que a resposta serológica na fase aguda da infecção (To *et al.*, 1996).

Os valores de seroprevalência intra-exploração, pelos motivos apresentados anteriormente, não devem ser lidos de uma forma estrita, como descrevendo o número de animais verdadeiramente infectados ou que possam manifestar sintomas da doença. Mais uma vez estes valores reflectem a circulação do agente em maior ou menor grau dentro da exploração e poderão, nos casos em que as seroprevalências são mais significativas, apontar para a suspeita da presença de animais excretores. Nestes casos deverá ser feita uma análise através de PCR a pelo menos 10% dos animais da exploração (Rodolakis *et al.*, 2007).

Devido ao desconhecimento da doença em Portugal e por se tratar do primeiro estudo sistematizado realizado em ovinos, o objectivo principal era identificar se os animais em estudo apresentavam serologia positiva a *C. burnetii*. Com este de estudo e com a técnica de diagnóstico utilizada, foi possível concluir que os animais identificados como positivos estiveram em contacto com o agente em alguma fase da sua vida. Embora não tenha sido possível identificar e caracterizar a circulação do mesmo nos animais, os resultados obtidos apontam para a sua existência na região de Montemor-o-Novo.

III. IMPACTO NA SAÚDE PÚBLICA

Estes dados alertam para a necessidade do planeamento e divulgação de medidas de biossegurança adequadas, particularmente quando em contacto com animais parturientes, para reduzir a prevalência nos reservatórios de *C. burnetii* e, por consequência, reduzir a prevalência de casos de Febre Q no Homem.

Nesta fase precoce do conhecimento da epidemiologia da doença em Portugal, o estudo seroepidemiológico para averiguar a presença do agente no efectivo ovino do concelho em estudo é um passo inicial importante neste domínio, sendo necessários mais estudos para caracterizar a epidemiologia da doença, bem como a sua distribuição no território Português.

Um futuro estudo mais aprofundado para rastreio da infecção animal deverá abranjer regiões mais alargadas e um maior número de explorações, de forma a avaliar a verdadeira dimensão e distribuição do agente, bem como um estudo analítico para identificar de factores de risco associados à transmissão da doença/manutenção nos reservatórios animais e que permita a aplicação de medidas preventivas.

A técnica a privilegiar deverá ser a ELISA, por ser a mais específica e permitir tratar rapidamente um grande número de soros, aplicada a amostras de soro ou em amostras de leite de tanque, associada, em caso de resultados positivos, a uma pesquisa por PCR nos esfregaços vaginais, no leite ou fezes para identificar animais excretores.

III.3 RESULTADOS

III.3.1. PORTUGAL

Em Portugal a Febre Q é de notificação obrigatória, sendo a forma crónica reconhecida como doença profissional pelo Decreto Regulamentar nº6/2001 de 5 de Maio (Diário da República I Série B, Nº104 de 5 de Maio de 2001, 2613-2638) que lista alguns dos trabalhos susceptíveis de provocar doença, como trabalhos que impliquem o contacto com animais (principalmente bovinos, caninos, felinos, leporídeos, caprinos, ovinos e cobras), seus despojos ou excreta; trabalhos efectuados em florestas; a prática da medicina veterinária e trabalhos de laboratório que impliquem contacto com o agente, designadamente a preparação de culturas e a produção de vacinas.

Embora exista contexto legal referente a esta doença, são escassos os estudos disponíveis que permitam inferir a real percentagem de pessoas e animais infectados.

As primeiras referências à doença em Portugal datam do final da década de 40, tendo sido identificados e seguidos clinicamente alguns pacientes humanos (Fonseca *et al.*, 1949). Em 1951 foi identificado um foco de Febre Q em bovinos (Figueiredo, 1951), subsequente à identificação de um caso clínico em Humanos. Já nessa época foi sublinhada a importância do estudo da Febre Q e da identificação dos focos endémicos em animais como forma de agir ao nível da saúde pública. Fonseca *et al.* (1949) concluíam que *“se os médicos e subdelegados de saúde, ao encontrarem um doente de Febre Q, procurarem o foco da infecção, investigando a sua origem no gado vacum, no gado caprino e ovino, muito ganharia a saúde pública, pois teríamos assim a possibilidade de melhor dominar esta doença que (...) parece existir em todo o País.”*

Um estudo realizado em Portugal em 1990 (Filipe *et al.*, 1990), em que se estudou uma amostra da população habitando em vários concelhos da região sul de Portugal, observou-se 2,2% (N=487) de seroprevalência do agente, variando segundo os concelhos amostrados (6,4% no distrito de Portalegre, 1,7% no distrito de Beja, 2,8% no distrito de Setúbal e não foi detectada no distrito de Évora).

Embora nunca tenham sido detectados surtos epidémicos da doença no nosso país, a sua notificação passou a ser obrigatória em 1999, registando-se, desde então, uma incidência aproximada de 0,14/10⁵ habitantes (1999-2003) (DGS, 2006).

Defende-se, contudo, que a situação da febre Q possa estar subavaliada (Santos *et al.*,

2007). Num estudo recentemente realizado no Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (CEVDI/INSA) (citado em Santos *et al.*, 2007), foi possível apurar que o número de casos de febre Q confirmados serologicamente naquele Centro em 2004 e 2005, num total de 32, ultrapassam as notificações registadas pela DGS em igual período, contabilizadas em 11 notificações (DGS, 2006), apontando claramente para a necessidade de uma real avaliação da importância desta doença no nosso país.

Os casos de Febre Q em Humanos reportados anualmente à DGS registam-se maioritariamente nas regiões Centro, Lisboa e Vale do Tejo e Alentejo (Tabela 21) e o grupo etário mais afectado é entre os 25 e os 65 anos, sendo os homens são mais atingidos que as mulheres (Tabela 22).

Tabela 21: Casos de Febre Q em Humanos em Portugal reportados à DGS, por região

Ano	Nº total	Norte	Centro	Lisboa e Vale do Tejo	Alentejo	Alarve	Regiões Autónomas
2000	11		2	4	4	1	
2001	19	1	3	13	2		
2002	15		3	9	3		
2003	10		4	5		1	
2004	6	1	1	4			
2005	1						
2006*	3		2	1			

Fonte: DGS (2006)

* dados do 1º e 2º trimestre

Tabela 22: Casos de Febre Q em Humanos em Portugal reportados à DGS, por grupo etário.

Ano	Sexo	≤4	5-14	15-24	25-34	35-44	45-54	55-64	65-74	≥75	Total
2000	H				3	3	1	1			8
	M					1		1	1		3
2001	H			3	3	4	3	2			15
	M			1	1	2					4
2002	H				2	2	3	1		2	11
	M					2	1	1			4
2003	H				2	1	2	2	1		8
	M							1	1		2
2004	H			1		2				1	3
	M	1						1			3
Total:		1		5	11	17	10	10	3	3	

Fonte: DGS (2006)

H: Homem; M: Mulher

III.3.2. OUTROS PAÍSES

A Tabela 23 mostra resultados de seroprevalência obtidos em Humanos em surtos recentes ocorridos em países de todo o mundo e a Tabela 24 relata os principais surtos ocorridos em Humanos e publicados desde 1999.

Tabela 23: Seroprevalência de Febre Q em Humanos obtida nos principais surtos ocorridos entre 1995-2003

País	Ano	Nº de indivíduos expostos	Nº de cidades	Testes utilizados	Seroprevalência nos Humanos (%)	Referência
Polónia	2003	90 (rural) 30 (urbano)	11 (aldeias) 1 (cidades)	IF	18 0	Cisak <i>et al.</i> , 2003
Canárias	2003	662	ND	IF	36	Bolanos <i>et al.</i> , 2003
Japão	2001	267 (veterinários) 352 (pessoal médico) 2003 (dadores de sangue)	ND	IF	13,5 5 4	Abe <i>et al.</i> , 2001
Japão	2000	200 (grávidas)	1	IF	4	Numazaki <i>et al.</i> , 2000
Taiwan	2000	616	ND	IF	4	Ko <i>et al.</i> , 2000
Chade	1999-2000	362	32	ELISA	1	Schelling <i>et al.</i> , 2003
Turquia	1998	102	ND	IF	8	Cetinkaya <i>et al.</i> , 2000
Canadá	1997-1998	7658 (grávidas)	ND	IF	4	Langley <i>et al.</i> , 2003
Espanha	1996-1997	1654	ND	IF	5	Lepe <i>et al.</i> , 1999
França	1996	12716	3	IF	0,15	Rey <i>et al.</i> , 2000
França	1995 1996	790 (dadores de sangue) 620 (dadores de sangue) 785 (população geral)	1	IF	0,4 3 5	Carrieri <i>et al.</i> , 2002

ND: Não Determinado

Adaptado de Arricau-Bouvery e Radolakis, 2005

Tabela 24: Principais surtos de Febre Q publicados desde 1999

Ano ^a	País	Origem	Nº de casos	Principais sinais clínicos	Diagnóstico	Ref
2003	Itália	Ovinos	133	Febre, tosse	IF	Santoro <i>et al.</i> , 2004
2002	França	Ovinos	88	Febre, cefaleia, ANT ^b	IF	^c
2000	França	Estrume de caprinos	10	Febre, mialgia, suores, cefaleia	IF	^d
2000	França	Estrume de ovinos	5	Febre, cefaleia, ANT	IF	Berri <i>et al.</i> , 2003
2000	Austrália	Desconhecida	16	Não descritos	FC	Chong <i>et al.</i> , 2003
1997	Bósnia	Ovinos	26	Indisposição, fadiga, cefaleia, febre	Serologia	Splino <i>et al.</i> , 2003
ND	Japão	Cães e gatos	2	Assintomático	IF & PCR	Komiya <i>et al.</i> , 2003
1996	França	Ovinos	29	Febre, mialgia, ANT	IFI	Carrieri <i>et al.</i> , 2002
ND	Japão	Viagem à Austrália	3	Febre, fadiga, ANT	IF & PCR	Kawamoto <i>et al.</i> , 2002
1999	Israel	? Trabalhadores de cozinha	16	Febre, cefaleia, hepatite, pneumonia	ELISA	Steiner <i>et al.</i> , 2001
1998	Austrália	Trabalhadores de matadouro de Ovinos	33	?	Serologia & PCR	Gilroy <i>et al.</i> , 2001
1996-2000	Guiana Francesa	Reservatório selvagem	132	Pneumopatia	IF	Gardon <i>et al.</i> , 2001
1999	Newfoundland Canadá	Caprinos	60	ITL, cefaleia, indisposição, febre	IF	Hatchette <i>et al.</i> , 2001
ND	Holanda	Férias em França	4	Pneumonia, hepatite	Serologia	Stevens <i>et al.</i> , 2000
1999	Alemanha	Ovinos, estrume	?	?	?	Reintjes <i>et al.</i> , 2000
?	Quênia	Caprinos	4	Febre, cefaleia, pneumonia	IF	Potasman <i>et al.</i> , 2000
1990-1995	França	Ovinos	289	Febre, cefaleia, ANT	IF	Tissot-Dupont <i>et al.</i> , 1999
1987-1988	Itália	Ovinos	235	Síndrome gripal	?	Boschini <i>et al.</i> , 1999

^a ano em que ocorreu o surto
^b ANT = aumento dos níveis de transaminase
^c www.sante.gouv.fr/html/actu/actu_ss/
^d www.invs.sante.fr/publications/2003/fevre_q/
ND: Não descrito

Adaptado de Arricau-Bouvery e Radolakis, 2005

Manteca (2005) fizeram uma recolha sistemática para identificar todos os resultados de estudos sistemáticos provenientes de ensaios pontuais para determinação de prevalências de Febre Q em todo o mundo (Tabela 25).

Tabela 25: Dados de meta-análise, em % de seropositividade para *C. burnetii* em diferentes espécies e países

País	Espécie	%	País	Espécie	%
Alemanha	Bovinos	7,6	Zâmbia	Humanos	8,2
Alemanha	Bovinos	0,5	Níger	Humanos	9,6
Alemanha	Ovinos	5,6	N. Zelândia	Bovinos	0
Alemanha	Ovinos	1,2	N. Zelândia	Cães	0
Bósnia	Humanos	19	Portugal	Cães	4,8
Canadá	Gatos	5	Roménia	Humanos	10,1
Canadá	Humanos	14,6	Roménia	Humanos	2,8
Canadá	Ovinos (expl.)	30	S. Salvador	Humanos	27
Espanha	Humanos	48,6	Senegal	Cães	11,6
Espanha	Humanos	46	Eslováquia	Cães	11,7
Espanha	Humanos	40,6	Sri Lanka	Bovinos	15
Espanha	Humanos	20,8	Sri Lanka	Caprinos	25
Espanha	Humanos	10	Suiça	Caprinos	0
Espanha	Humanos	5,1	Suiça	Humanos	20
França	Cães	9,8	Taiwan	Humanos	4,2
França	Humanos	4	Tanzânia	Humanos	4,7
França	Humanos	0,2	R. Checa	Bovinos	12
Marrocos	Bovinos (expl.)	9	R. Checa	Humanos	1,1
Marrocos	Humanos	18,3	Guiana F.	Cães	5,2
Marrocos	Humanos	1	Irão	Humanos	27
Tunísia	Humanos	26	Itália	Cães	0,9
Turquia	Bovinos	5,8	Itália	Humanos	3,6
Turquia	Humanos	12	Japão	Bovinos	30
Turquia	Ovinos	10,5	Malawi	Bovinos	1,5
Zimbabué	Bovinos	41	Etiópia	Humanos	6,5
Zimbabué	Bovinos	39	C. Marfim	Cães	8,3
Zimbabué	Caprinos	10	Zimbabué	Cães	15
Zimbabué	Gatos	13	Zimbabué	Humanos	37

Adaptado de Manteca, 2005

Estes resultados mostram, de uma forma muito simples, que existe seroprevalência significativa, em muitos países, um pouco por todo o Mundo.

III.4 DISCUSSÃO

A prevalência da Febre Q em Humanos, tal como nos animais, não é conhecida com precisão, e é provavelmente subestimada, uma vez que as múltiplas formas da doença dificultam o diagnóstico clínico. Estudos de seroprevalência realizados em dadores de sangue sugerem que a exposição a *C. burnetii* é comum nos países onde os testes são realizados (Arricau-Bouvery e Radolakis, 2005).

Os resultados de meta-análise apresentados por Manteca (2005) demonstram que quase todas as regiões do Mundo, espécies animais e tipos de manejo zootécnico estão envolvidos na problemática da Febre Q. Os autores denotam, no entanto, que a metodologia não está padronizada e que, por isso, não é possível extrapolar qualquer tipo de comparação. Os mesmos aludem ainda para o facto de os valores reais da doença em animais e humanos serem, na maioria dos casos, subestimados pelos veterinários, autoridades de saúde e produtores.

O número de publicações sobre surtos e o estudo retrospectivo dos casos isolados ou manifestações clínicas pouco comuns tem crescido desde 1999 (Arricau-Bouvery e Radolakis, 2005).

Os casos mais recentes de Febre Q foram descritos na Austrália (Speelman, 1982; Garner *et al.*, 1997; Yohannes *et al.*, 2004), Canadá (Marie, 1988; Langley *et al.*, 2003), Alemanha (Hellenbrand *et al.*, 2001), Japão (Takahashi *et al.*, 2004), Espanha (de Alarcon, *et al.*, 2003; Sampere *et al.*, 2003), Suíça e Reino Unido (Pebody *et al.*, 1996).

A Febre Q é uma doença de origem aérea. As infecções podem ocorrer após inalação de aerossóis gerados a partir de placentas, fluidos corporais ou poeiras contaminadas resultantes de estrume contaminado e dessecação de placentas e fluidos corporais infectados. A transmissão de *C. burnetii* está, na maioria das vezes associada ao aborto dos ruminantes domésticos, particularmente os ovinos.

Vários autores descreveram uma variação sazonal na incidência da doença em humanos durante a Primavera e o início do Verão, o que tem sido atribuído ao período de partos durante a Primavera e a tosquia, conduzindo à contaminação ambiental (Tissot-Dupont *et al.*, 1999; Hellenbrand *et al.*, 2001). Não é portanto necessário o contacto directo com os materiais abortados ou com as fêmeas que abortam.

As pessoas podem contaminar-se pela manipulação de lã contaminada (Abinanti *et al.*,

1955), estrume (Berri *et al.*, 2003) ou roupas contaminadas com fezes (Babudieri, 1959) ou transumância de rebanhos infectados através de um vale (Dupuis *et al.*, 1987).

Entre Novembro e Junho de 2002, no Vale de Chamonix em França, foram identificados 88 casos de Febre Q em Humanos, 71 dos quais com sinais clínicos e 10 que necessitaram de hospitalização. Os estudos conduzidos indicam que o surto teve origem na transmissão aérea a partir de rebanhos infectados presentes no Vale desde Junho. (http://www.sante.gouv.fr/htm/actu/actu_ss/)

Na Bulgária o aumento do número de casos de Febre Q foi associado ao aumento do número de cabras que diariamente se deslocam às aldeias e pequenas cidades para pastagem (Serbezov *et al.*, 1999).

A sobrevivência ambiental de *C. burnetii* permite que seja transportada pelo vento para locais distantes dos seus pontos de origem (Lyytikainen *et al.*, 1997; Hellenbrand *et al.*, 2001; Carrieri *et al.*, 2002). Isto pode contribuir para o aparecimento de casos de Febre Q em áreas urbanas, onde uma percentagem importante de indivíduos afectados não tem contacto directo com animais (Sampere *et al.*, 2003).

Na Alemanha, uma publicação de 2001 fez o ponto de situação de 40 epidemias entre 1947 e 1999 (Hellenbrand *et al.*, 2001). Os autores observaram que as epidemias são cada vez mais registadas em zonas urbanas. 24 epidemias estavam ligadas a ovinos, dos quais 11 se deveram a manipulação de produtos do parto, uma à manipulação de camas de palha, três à manipulação da lã, 12 à passagem de rebanhos nas proximidades e 14 ao vento e à seca. Seis das epidemias tiveram origem em bovinos, das quais quatro foram comunitárias (manipulação de abortos, feiras de gado) e duas em matadouros. Duas epidemias, as mais antigas, surgiram em laboratórios de pesquisa, enquanto que, para oito das epidemias, não foi identificada nenhuma origem.

As aves domésticas e selvagens podem também transmitir a Febre Q através das fezes ou dos seus ectoparasitas, podendo ser responsáveis por casos humanos em áreas urbanas ou sem contacto aparente com animais (Arricau-Bouvery e Radolakis, 2005).

As carraças são consideradas como um reservatório principal e vector de *C. burnetii* em vários países. *C. burnetii* tem capacidade de infectar mais de 40 espécies de carraças, mas o seu papel na transmissão da doença parece variar consoante o país (McDiarmid *et al.*, 2000; Kovacova e Kazar, 2002; Spyridaki *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004). Em França, a transmissão por carraças parece afectar principalmente os animais selvagens e menos os animais

domésticos (Arricau-Bouvery e Radolakis, 2005). As carraças transmitem o agente através de mordedura ou pelas fezes aos pássaros, roedores e ruminantes (Lang, 1990). A infecção dos ovários de certos tipos de carraças foi relatada e pode levar à transmissão à descendência, permitindo que *C. burnetii* permaneça na população de carraças (Lang, 1990).

A ingestão de leite contaminado induziu a seroconversão em humanos voluntários, sem, contudo, manifestar sinais clínicos da doença (Benson *et al.*, 1963; Krumbiegel *et al.*, 1970). Embora alguns estudos tenham relatado a existência de doença clínica relacionada com a ingestão de queijo (Fishbein e Raoult, 1992; Hatchette *et al.*, 2001), os resultados obtidos têm sido contestados, uma vez que é difícil garantir que os pacientes não tiveram contacto com poeiras ou aerossóis. Por outro lado, não são conhecidos estudos sobre a ingestão de doses massivas de *C. burnetii* ou de doses moderadas por pessoas em risco, tais como mulheres grávidas, indivíduos imunocomprometidos ou com valvulopatias (Arricau-Bouvery e Radolakis, 2005).

Nos animais domésticos, a contaminação por via oral de bovinos, ovinos e caprinos através da ingestão de placentas infectadas é também considerada como menor, embora não tenha sido estudada (Arricau-Bouvery e Radolakis, 2005). No entanto, admite-se que cães e gatos possam ser infectados pela ingestão de placentas altamente infectadas (cerca de 10^9 bactérias por grama) (Babudieri, 1959).

Apreciação do risco de exposição

A exposição tem em conta as diferentes vias de exposição e as populações expostas ao risco.

Existem várias vias de exposição a *C. burnetii*:

- o contacto directo com ruminantes domésticos excretores;
- a via aérea que pode existir à distância;
- a via alimentar;

a contaminação pelo ciclo selvagem: contaminação essencialmente por carraças.

Diferentes populações expostas

Todas as pessoas que são expostas, não o são da mesma maneira.

Em termos de exposição, a AFSSA (2004) distingue diversas populações:

Os indivíduos **em contacto directo, estreito e habitual (mais frequentemente profissional) com os ruminantes** (criadores, veterinários, trabalhadores dos matadouros).

Um estudo inglês fez a observação de uma coorte de 404 indivíduos que trabalhavam em explorações animais, comparados com 395 testemunhas (Thomas *et al.* 1994; 1995). A seroprevalência era cerca de três vezes mais elevada nos criadores (27,3%) que nas testemunhas (10,9%). A presença de anticorpos anti-*C. burnetii* estava significativamente associada ao contacto com os animais gestantes e com os produtos da gestação.

Esta população apresenta, segundo a AFSSA (2004) o risco mais elevado de exposição à *C. burnetii*. A exposição é, portanto, qualificada como **moderada a elevada** por via aérea.

As populações com **exposição rural, directa ou indirecta**: vizinhos das explorações, adeptos do turismo rural, visitantes de quintas pedagógicas. Os caçadores e outros adeptos de caminhadas na natureza, além da exposição aos rebanhos, podem também estar expostos à fauna selvagem (para a qual o conhecimento é muito limitado) e de uma sobre-exposição às carraças (ainda que a sua importância na transmissão da doença possa ser discutível, senão muito raramente confirmada).

Como as epidemias demonstram regularmente, esta população, embora menos exposta que a precedente, possui na mesma um risco de contacto com a bactéria, sendo considerada como de risco **fraco a moderado**.

A **população geral**, principalmente urbana, mais raramente em contacto com os ruminantes domésticos e que não vive numa zona de possível contaminação aérea. Pode estar exposta aos aerossóis transportados à distância, ou devido a passagens de rebanhos. Esta população está globalmente pouco exposta.

A Febre Q, sob a forma clínica ligada ao consumo de alimentos crus não deve ser excluída, mas nunca foi demonstrada com certeza; por esta razão, a apreciação qualitativa da exposição foi considerada como “nula a negligenciável” para as três categorias da população (AFSSA, 2004).

IV. CONCLUSÃO

A revisão bibliográfica efectuada revelou a existência de um interesse crescente pela Febre Q, a nível mundial, manifestado pelo grande número de publicações recentes sobre a matéria, particularmente revisões bibliográficas e documentação de surtos ocorridos em animais e no Homem. Esta atenção por parte da comunidade científica internacional poderá estar relacionada com a classificação do agente da Febre Q como arma de terrorismo biológico ou com um eventual carácter emergente desta zoonose.

Muito ainda há para descobrir no que se refere ao ciclo de vida de *C. burnetii* e fisiopatogenia da doença nos hospedeiros. Os mecanismos pelos quais se rege a modulação da resposta imunitária à infecção por *C. burnetii* e, sobretudo as estratégias usadas pela bactéria para persistir nas células dos hospedeiros infectados, não estão completamente elucidados. Na última década, porém, têm surgido numerosas publicações que contribuem para o conhecimento da patogenia da Febre Q crónica, sendo este um aspecto primordial para o avanço no combate à doença no Homem.

Contudo, apesar das diversas publicações e do aumento da divulgação da doença, a prevalência da Febre Q continua a ser conhecida com pouca precisão, quer no Homem, quer em animais. Vários factores podem estar implicados. O facto de a infecção ser muitas vezes quase inaparente nos animais, de se manifestar através de um quadro clínico ambíguo e pouco específico nos casos agudos no Homem e de ser de difícil diagnóstico, também nos casos crónicos, faz com que seja frequentemente sub-diagnosticada. Logo, a verdadeira incidência estará sub-notificada.

Em Portugal, a doença é quase totalmente desconhecida, sobretudo no que diz respeito aos animais. Não existem, por um lado, estudos que indiquem a presença do agente no país e não existe, por outro, uma consciência plena, por parte dos profissionais de saúde, sobre a real prevalência da Febre Q.

Consideramos que a revisão bibliográfica aqui apresentada pode constituir um instrumento relevante para futuros trabalhos nesta área. Acreditamos dar também, desta forma, um contributo para o aumento da divulgação e conhecimento da doença para os agentes na área da saúde animal nacional.

Os dados obtidos no estudo seroepidemiológico da Febre Q em ovinos no concelho de Montemor-o-Novo, com a técnica ELISA, permitiram obter uma proporção de 57% de explorações com pelo menos um animal positivo, numa amostra de 35. Estes resultados indicam que os animais testados como positivos estiveram em contacto com *C. burnetii*.

Embora a dimensão da amostra seja limitada, os resultados obtidos apontam para que o agente da Febre Q se encontre em circulação na região de Montemor-o-Novo, o que implica um risco de infecção para o Homem, comprovado pela existência de casos de Febre Q em Humanos na referida região.

São necessários mais estudos, nomeadamente através da técnica de PCR, para confirmar a presença do agente e determinar se este está em circulação nos rebanhos. Para tal, deverão ser postos em prática protocolos que multipliquem a amostra por um número suficiente de animais e que sejam aplicados de forma continuada no tempo, para determinar o estágio da infecção. Desta forma poderá prever-se o cenário entre rebanhos que será predominante, relativamente à existência de animais portadores/excretadores à escala do rebanho e daí inferir os riscos para a saúde pública.

A exposição humana à *C. burnetii* é multifactorial, pelo que os estudos epidemiológicos nem sempre permitem diferenciar a exposição directa por contacto com os animais da exposição indirecta, ambiental, por inalação de poeiras infectadas, ou por mordedura de carraças. A noção de exposição alimentar raramente é posta em evidência. Em alguns países da Europa, na maioria dos inquéritos epidemiológicos, chegou-se à conclusão que houve contacto, indirecto na maior parte das vezes, com rebanhos.

A cinética de excreção bacteriana pelas diferentes vias tem, recentemente, vindo a ser estudada com alguma frequência nos ruminantes. *C. burnetii* pode estar potencialmente presente nas diferentes secreções e excreções de todos os animais infectados, e alguns trabalhos disponíveis recentemente começaram a fornecer informações, em termos de intensidade, de duração ou de frequência. Estes padrões são, no entanto, muito variáveis de espécie para espécie e mesmo entre animais.

A excreção é máxima nas épocas de parto, estando correlacionada com a carga bacteriana das placentas. Estima-se que está presente uma grande concentração de bactérias nas secreções vaginais, leite e fezes após o parto e que, depois, este número entra em queda, podendo, porém, nalguns casos, manter-se. Deste modo, a dispersão no ambiente pode surgir repentinamente, principalmente nas épocas de parto. Apesar disso, infecção do Homem por poeiras pode ser distribuída ao longo do tempo, em virtude das características de sobrevivência do agente no meio externo.

C. burnetii é muito resistente na natureza e pode sobreviver durante várias semanas nas áreas onde os animais estiveram presentes, sendo disseminado pelo vento. Assim se justifica que sejam descritos surtos de Febre Q e casos esporádicos em pacientes sem contacto prévio

com animais.

O conjunto destes estudos sublinha que a presença de rebanhos, mais frequentemente de ovinos, está na origem da maior parte das epidemias cuja origem foi identificada. Deste modo, a existência de vacinas em fase I que reduzem consideravelmente a duração da excreção fecal e vaginal de *C. burnetii* e a quantidade de bactérias excretadas pelos ruminantes infectados abre novas perspectivas futuras para o controlo da doença e prevenção da infecção do Homem.

V. BIBLIOGRAFIA

- Abe T., Yamaki K., Hayakawa T., Fukuda H., Ito Y., Kume H., Komiya T., Ishihara K., Hirai K. 2001. A seroepidemiological study of the risks of Q fever infection in Japanese veterinarians. *European Journal of Epidemiology*. 17:1029–32.
- Abinanti F.R., Welsh H.H., Winn J.F., Lennette E.H. 1955. Q fever studies. XIX. Presence and epidemiologic significance of *Coxiella burnetii* in sheep wool. *American Journal of Hygiene*. 61:362.
- Adesiyun A.A., Jagun A.G., Kwaga J.K., Tekdek L.B. 1985. Shedding of *Coxiella burnetii* in milk by Nigerian dairy and dual purposes cows. *International Journal of Zoonoses*. 12(1):1-5.
- AFSSA (2004) Fièvre Q: Rapport sur l'évaluation des risques pour la santé publique et des outils de gestion des risques en élevage de ruminants. *Comité d'experts spécialisé « Santé animale »*. www.afssa.fr/ftp/afssa/27623-27624.pdf (accedido em Maio de 2006)
- Aitken, I. D. 1989. Clinical aspects and prevention of Q fever in animals. *European Journal of Epidemiology*. 5:420–4.
- Akporiaye E.T., Rowatt J.D., Aragon A.A., Baca O.G. 1983. Lysosomal response of a murine macrophage-like cell line persistently infected with *Coxiella burnetii*. *Infection and Immunity*. 40(3):1155–62.
- de Alarcon A., Villanueva J.L., Viciano P., Lopez-Cortes L., Torronteras R., Bernabeu M., Cordero E., Pachon J., 2003. Q fever: epidemiology, clinical features and prognosis. A study from 1983 to 1999 in the South of Spain. *The Journal of Infection*. 47:110–6.
- Andoh M., Naganawa T., Hotta A., Yamaguchi T., Fukushi H., Masegi T., Hirai K. 2003. SCID mouse model for lethal Q fever. *Infection and immunity*. 71(8):4717-23.
- Arricau-Bouvery N., Souriau A., Rodolakis A. 2001. Excrétion de *Coxiella burnetii* dans le lait : suivi d'un troupeau bovin. Rencontre des microbiologistes de l'INRA. Dourdan.
- Arricau-Bouvery N., Souriau A., Lechopier P., Rodolakis A., 2003. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: excretion routes. *Veterinary Research*. 34(4):423–33.
- Arricau-Bouvery N., Rodolakis A. 2005. Is Q Fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Veterinary Research*. 36(3):327-49.
- Arricau-Bouvery N., Souriau A., Bodier C., Dufour P., Rousset E., Rodolakis A. 2005. Effect of vaccination with phase I and phase II *Coxiella burnetii* vaccines in pregnant goats. *Vaccine*. 23(35):4392–402.
- Baca O.G., Paretsky D. 1983. Q fever and *Coxiella burnetii*: a model for host-parasite interactions. *Microbiological Reviews*. 47(2):127-49.
- Babudieri, B. 1959. Q fever: a zoonosis. *Advances in Veterinary Sciences*. 5:82-182.
- Barandika J.F., Hurtado A., García-Esteban C., Gil H., Escudero R., Barral M., Jado I., Juste R.A., Anda P., García-Pérez A.L. 2007. Tick-borne zoonotic bacteria in wild and domestic small mammals in northern Spain. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(19):6166-71.
- Baccelar F., Dawson J.E., Silveira C.A., Filipe A.R. 1995. Antibodies against *Rickettsiaceae* in dogs of Setúbal, Portugal. *Central European journal of public health*. 3(2):100-2.
- Becht H., Hess E. 1964. Zur Epizootologie, Diagnostik und Bekämpfung des Q-fiebers beim Rind. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*. 106(7):389-399.
- Behymer D. E., Biberstein E. L., Riemann H. P., Franti C. E., Sawyer M., Ruppanner R., Crenshaw G. L. 1976. Q fever (*Coxiella burnetii*) investigations in dairy cattle: challenge of

- immunity after vaccination. *American Journal of Veterinary Research*. 37(6):631–64.
- Behymer D., Ruppner, Riemann R., Biberstein H.P., Franti E.L., C.E. 1977. Observation on chemotherapy in cows chronically infected with *Coxiella burnetii* (Q fever). *Folia Veterinaria Latina*. 7(1):64-70.
- Bell E.J., Parker R.R., Stoenner H.G. 1949. Q fever, experimental Q fever in cattle. *American Journal of Public Health*. 39(4):478-84.
- Benson W.W., Brock D.W., Mather J., 1963. Serologic analysis of a penitentiary group using raw milk from a Q fever infected herd. *Public Health Reports*. 78:707–10.
- Berón W., Gutierrez M.G., Rabinovitch M., Colombo M.I. 2002. *Coxiella burnetii* localizes in a Rab7-labeled compartment with autophagic characteristics. *Infection and Immunity*. 70(10):5816-21.
- Berri M., Laroucau K., Rodolakis A. 2000. The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*. 72(3-4):285–93.
- Berri M., Souriau A., Crosby M., Crochet D., Lechopier P., Rodolakis A. 2001. Relationship between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep. *The Veterinary Record*. 148(16):502-05.
- Berri M., Souriau A., Crosby M., Rodolakis A. 2002. Shedding of *Coxiella burnetii* in ewes in two pregnancies following an episode of *Coxiella burnetii* abortion in a sheep flock. *Veterinary Microbiology*. 85(1):55-60.
- Berri M., Rousset E., Champion J.L., Arricau-Bouvery N., Russo P., Pepin M., Rodolakis A. 2003. Ovine manure used as a garden fertilizer is suspected to be a contamination source of two human Q fever cases. *The Veterinary Record*. 153(9):269–70.
- Berri M., Rousset E., Champion J.L., Russo P., Rodolakis A. 2007. Goats may experience reproductive failures and shed *Coxiella burnetii* at two successive parturitions after a Q fever infection. *Research in Veterinary Science*. 83(1):47-52.
- Biberstein, E.L., Riemann, H.P., Franti, C.E., Behymer, D.E., Ruppner, R., Bushnell, R., Crenshaw, G. 1977. Vaccination of dairy cattle against Q fever (*Coxiella burnetii*): results of field trials. *American Journal of Veterinary Research*. 38(2):189-93.
- Bildfell R.J., Thomson G.W., Haines D.M., McEwen B.J., Smart N. 2000. *Coxiella burnetii* infection is associated with placentitis in cases of bovine abortion. *Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation*. 12(5):419-25.
- Blondeau, J.M., Williams, J.C., Marrie, T.J. 1990. The immune response to phase I and phase *Coxiella burnetii* antigens as measured by western immunoblotting. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 590:187-202.
- Bolanos M., Santana O.E., Angel-Moreno A., Perez-Arellano J.L., Liminana J.M., Serra-Majem L., Martin-Sanchez A.M., 2003. Seroprevalence of infection by *Coxiella burnetii* in Canary Islands (Spain). *European Journal of Epidemiology*. 18(3):259–62.
- Boni M., Davoust, B., Tissot-Dupont H., Raoult D. 1998. Survey of seroprevalence of Q fever in dogs in the southeast of France, French Guyana, Martinique, Senegal and the Ivory Coast. *Veterinary Microbiology*. 64(1):1-5.
- Boschini A., Di Perri G., Legnani D., Fabbri P., Ballarini P., Zucconi R., Boros S., Rezza G., 1999. Consecutive epidemics of Q fever in a residential facility for drug abusers: impact on persons with human immunodeficiency virus infection. *Clinical Infectious Diseases*. 28(4):866–72.

- Brennan R.E., Russell K., Zhang G., Samuel J.E. 2004. Both inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase contribute to the control of virulent phase I *Coxiella burnetii* infections. *Infection and Immunity*. 72(11):6666–75.
- Brennan R.E., Samuel J.E. 2003. Evaluation of *Coxiella burnetii* antibiotic susceptibilities by real-time PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(5):1869-74.
- Brooks D. L., Ermel R. W., Franti C. E., Ruppanner R., Behymer D. E., Williams J. C., Stephenson J. C. 1986. Q fever vaccination of sheep: challenge of immunity in ewes. *American Journal of Veterinary Research*. 47(6):1235–8.
- Buhariwalla F., Cann B., Marrie T.J. 1996. A dog-related outbreak of Q fever. *Clinical Infectious Diseases*. 23(4):753-5.
- Burton P. R., Kordova N., Paretsky D. 1971. Electron microscopic studies of the rickettsia *Coxiella burnetii*: entry, lysosomal response, and fate of rickettsial DNA in L-cells. *Canadian Journal of Microbiology* 17(2):143–50.
- Cabassi C.S., Taddei S., Donofrio G., Ghidini F., Piancastelli C., Flammini C.F., Cavirani S. 2006. Association between *Coxiella burnetii* seropositivity and abortion in dairy cattle of Northern Italy. *The New Microbiologica*. 29(3):211-4.
- Canonico P.G., Van Zwieten M.J., Christmas W.A. 1972. Purification of large quantities of *coxiella burnetii* rickettsia by density gradient zonal centrifugation. *Applied Microbiology*. 23(5):1015-22.
- Capo C., Zugun F., Stein A., Tardei G., Lepidi H., Raoult D., Mege J-L. 1996. Upregulation of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in Q fever endocarditis. *Infection and Immunity* 64(5):1638–42.
- Capo C., Lindberg F. P., Meconi S., Zaffran Y., Tardei G., Brown E.J., Raoult D., Mege J.L. 1999. Subversion of monocyte functions by *Coxiella burnetii*: impairment of the cross-talk between $\alpha_v\beta_3$ integrin and CR3. *Journal of Immunology*. 163(11):6078–85.
- Capo C., Moynault A., Collette Y., Olive D., Brown E.J., Raoult D., Mege J.L. 2003. *Coxiella burnetii* avoids macrophage phagocytosis by interfering with spatial distribution of complement receptor 3. *Journal of Immunology*. 170(8):4217-25.
- Capuano F., Landolfi M.C., Monetti D.M., 2001. Influence of three types of farm management on the seroprevalence of Q fever as assessed by an indirect immunofluorescence assay, *The Veterinary Record*. 149(22):669–71.
- Capuano F. 2004 *Coxiella burnetii*: what is the reality? *Parassitologia* 46(1-2):131-4
- Carrieri M.P., Tissot-Dupont H., Rey D., Brousse P., Renard H., Obadia Y., Raoult D., 2002. Investigation of a slaughterhouse-related outbreak of Q fever in the French Alps. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 21(1):17–21.
- CDC (2007). Q fever. www.cdc.gov/ncidod/dvrd/qfever/ (acedido em 30 de Setembro de 2007).
- Çekani M., Papa A., Kota M., Velo E., Berxholi K. 2008. Report of a serological study of *Coxiella burnetii* in domestic animals in Albania. *Veterinary Journal*. 175(2):276-8.
- Cetinkaya B., Kalender H., Ertas H.B., Muz A., Arslan N., Ongor H., Gurcay M., 2000. Seroprevalence of coxiellosis in cattle, sheep and people in the east of Turkey, *The Veterinary Record*. 146(5):131–6.
- Chong A.K., La Brooy J., Norton R., Masson J., 2003. Q fever: a recent “outbreak” in Townsville. *Internal Medicine Journal*. 33(4):208–10.

- Cisak E., Chmielewska-Badora J., Mackiewicz B., Dutkiewicz J., 2003. Prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* among farming population in eastern Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 10(2):265–7.
- Cooper A., Layton R., Owens L., Ketheesan N., Govan B. 2007. Evidence for the classification of a crayfish pathogen as a member of the genus *Coxiella*. *Letters in Applied Microbiology*. 45(5):558-63.
- Cowley R., Fernandez F., Freemantle W., Rutter D. 1992. Enzyme immunoassay for Q fever: comparison with complement fixation and immunofluorescence tests and dot immunoblotting. *Journal of Clinical Microbiology*. 30(9):2451-5.
- Cutler S.J., Bouzid M., Cutler R.R. 2007. Q fever. *The Journal of Infection*. 54(4):313-8.
- Damrow T.A., Williams J.C., Waag D.M. 1985. Suppression of in vitro lymphocyte proliferation in C57BL/10 ScN mice vaccinated with phase I *Coxiella burnetii*. *Infection and Immunity*. 47(1):149–56.
- Dellacasagrande J., Capo C., Raoult D., Mege J.-L. 1999. IFN- γ mediated control of *Coxiella burnetii* survival in monocytes: the role of cell apoptosis and TNF. *Journal of Immunology*. 162(4):2259–65.
- DGS. 2006. <http://www.dgsaude.pt> (acedido em 15 de Novembro de 2007). DGV. 2004. Boletim Zoosanitário (1998-2002).
- Dobija-Domaradzki M., Hausser J.L., Gosselin F. 1984. [Coexistence of Legionnaires' disease and Q fever in a single patient]. *Canadian Medical Association Journal*. 130(8):1022-3.
- Doller G., Doller P.C., Gerth H.J. 1984. Early diagnosis of Q fever: detection of immunoglobulin M by radioimmunoassay and enzyme immunoassay. *European Journal of Clinical Microbiology*. 3(6):550-3.
- Dupuis G., Petite J., Peter O., Vouilloz M. 1987. An important outbreak of human Q fever in a Swiss Alpine valley. *International Journal of Epidemiology*. 16(2):282–7.
- Durand M.P., Limouzin C. 1983. Un problème d'hygiène alimentaire : à propos du risque potentiel du lait de vaches infectées par *Coxiella burnetii* sur la santé humaine. *Bulletin De L'academie Veterinaire De France*. 56:475-85.
- Durand M.P. 1993. L'excrétion lactée et placentaire de *Coxiella burnetii*, agent de la fièvre Q chez la vache. Importance et prévention. *Bulletin De L'academie Veterinaire De France*. 177(6):935-45.
- Dwyer, D.E., Gibbons, V.L., Brady, L.M., Cunningham, A.L. 1988. Serological reaction to *Legionella pneumophila* group 4 in a patient with Q fever. *The Journal of Infectious Diseases*. 158(2):499-500.
- Ejercito C.L., Cai L., Htwe K.K., Taki M., Inoshima Y., Kondo T., Kano C., Abe S., Shirota K., Sugimoto T., 1993. Serological evidence of *Coxiella burnetii* infection in wild animals in Japan. *Journal of Wildlife Diseases*. 29(3):481-4.
- Eklund C.M., Parker R.R., Lackman D.B. 1947. A case of Q fever probably contracted by exposure to ticks in nature. *Public Health Reports*. 62:1413-16.
- Enright J.B., Walter M., Sadler W.W., Thomas R.C. 1957. Pasteurization of milk containing the organism of Q fever. *American Journal of Public Health* 47, 695-700.
- Euzéby J.P. 2001. *Coxiella burnetii*: Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire. (www.bacterio.cict.fr/bacdico/cc/coxiella.html, acedido em 30 de Setembro de 2007).

- Field P.R., Mitchell J.L., Santiago A., Dickeson D.J., Chan S.W., Ho D.W., Murphy A.M., Cuzzubbo A.J., Devine P.L. 2000. Comparison of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay with immunofluorescence and complement fixation tests for detection of *Coxiella burnetii* (Q fever) immunoglobulin M. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(4):1645–7.
- Figueiredo L., 1951. Nota clínica sobre um foco de febre Q. *Gazeta Médica Portuguesa*. 4(IV):962-3.
- Filipe A.R., Bacellar F., David de Morais, J.A. 1990. Anticorpos contra *Rickettsiae* na população do sul de Portugal. *Separata da Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*. 13(2): 85-9.
- Finidori J.P., Raoult D., Bornstein N., Fleurette J. 1992. Study of cross-reaction between *Coxiella burnetii* and *Legionella pneumophila* using indirect immunofluorescence assay and immunoblotting. *Acta Virologica*. 36(5):459-65.
- Fiset P., Ormsbee R.A., Silberman R., Peacock M., Spielman S.H. 1969. A microagglutination technique for detection and measurement of rickettsial antibodies. *Acta Virologica*. 13(1):60-6.
- Fishbein D.B., Raoult D., 1992. A cluster of *Coxiella burnetii* infections associated with exposure to vaccinated goats and their unpasteurized dairy products. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 47(1):35–40.
- Fonseca F., Pinto M.R., Fraga de Azevedo J., Lacerda M.T. (1949) Febre Q em Portugal. *Clínica contemporânea, revista de medicina e cirurgia*. Tomo III, nº 28.
- Fournier P.E., Marrie T.J., Raoult D. 1998. Diagnosis of Q fever. *Journal of Clinical Microbiology*. 36(7): 1823-34.
- Fretz R., Schaeren W., Tanner M., Baumgartner A. 2007. Screening of various foodstuffs for occurrence of *Coxiella burnetii* in Switzerland. *International Journal of Food Microbiology*. 116(3):414-8.
- Gardon J., Heraud J.M., Laventure S., Ladam A., Capot P., Fouquet E., Favre J., Weber S., Hommel D., Hulin A., Couratte Y., Talarmin A., 2001. Suburban transmission of Q fever in French Guiana: evidence of a wild reservoir. *The Journal of Infectious Diseases*. 184(3):278–84.
- Garner M.G., Longbottom H.M., Cannon R.M., Plant A.J., 1997. A review of Q fever in Australia 1991–1994. *Australian and New Zealand Journal of Public Health* 21(7):722–30.
- Ghigo E., Capo C., Raoult D., Mege J. L. 2001. Interleukin-10 stimulates *Coxiella burnetii* replication in human monocytes through tumor necrosis factor downmodulation: role in microbicidal defect of Q fever. *Infection and Immunity*. 69(4):2345–52
- Ghigo E., Capo C., Tung C.H., Raoult D., Gorvel J.P., Mege J.L. 2002. *Coxiella burnetii* survival in THP-1 monocytes involves the impairment of phagosome maturation: IFN-gamma mediates its restoration and bacterial killing. *The Journal of Immunology*. 169(8):4488-95.
- Ghigo E., Honstetter A., Capo C., Gorvel J.P., Raoult D., Mege J.L. 2004. Link between impaired maturation of phagosomes and defective *Coxiella burnetii* killing in patients with chronic Q fever. *The Journal of Infectious Diseases*. 190(10):1767-72.
- Gilroy N., Formica N., Beers M., Egan A., Conaty S., Marmion B., 2001. Abattoir-associated Q fever: a Q fever outbreak during a Q fever vaccination program. *Australian and New Zealand Journal of Public Health*. 25(4):362–7.

- Gimenez D.F. 1964. Staining rickettsiae in yolk-sack cultures. *Stain Technology*. 30:135-7.
- Giroud P., Jardin J. 1954. [Latent infection and preservation of *Rickettsia burneti* in man; the role of the tick.] *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*. 47(6):764-5.
- Guatteo R., Beaudeau F., Berri M., Rodolakis A., Joly A., Seegers H. 2006. Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. *Veterinary Research*. 37(6):827-33.
- Guatteo R., Beaudeau F., Joly A., Seegers H. 2007. *Coxiella burnetii* shedding by dairy cows. *Veterinary Research*. 38(6):849-60
- Hackstadt T., Williams J.C., 1981. Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukaryotic cells by *Coxiella burnetii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 78(5):3240-4.
- Harris R.J., Storm P.A., Lloyd A., Arens M., Marmion B.P. 2000. Long-term persistence of *Coxiella burnetii* in the host after primary Q fever. *Epidemiology and Infection*. 124(3):543-9.
- Hatchette T.F., Hudson R.C., Schlech W.F., Campbell N.A., Hatchette J.E., Ratnam S., Raoult D., Donovan C., Marrie T.J., 2001. Goat associated Q fever: a new disease in Newfoundland. *Emerging Infectious Diseases*. 7(3):413-9.
- Hatchette T., Campbell N., Whitney H., Hudson R., Marrie T.J. 2002. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in selected populations of domestic ruminants in Newfoundland. *The Canadian Veterinary Journal*. 43(5):363-4.
- Hawker J.I., Ayres J.G., Blair I., Evans M.R., Smith D.L., Smith E.G., Burge P.S., Carpenter M.J., Caul E.O., Coupland B., Desselberger U., Farrell I.D., Saunders P.J., Wood M.J. 1998. A large outbreak of Q fever in the West Midlands: windborne spread into a metropolitan area? *Communicable Disease and Public Health*. 1(3):180-7.
- Heinzen R., Stiegler G.L., Whiting L.L., Schmitt S.A., Mallavia L.P., Frazier M.E. 1990. Use of pulsed field gel electrophoresis to differentiate *Coxiella burnetii* strains. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 590:504-13.
- Heinzen R. A., Scidmore M. A., Rockey D. D., Hackstadt T. 1996. Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity*. 64(3):796-809.
- Heinzen R.A., Hackstadt T., Samuel J.E. 1999. Developmental biology of *Coxiella burnetii*. *Trends in Microbiology*. 7(4):149-54.
- Hellenbrand W., Breuer T., Petersen L. 2001. Changing epidemiology of Q fever in Germany, 1947-1999. *Emerging Infectious Diseases*. 7(5):789-96.
- Herr S., Huchzermeyer H.F., Te Brugge L.A., Williamson C.C., Roos J.A., 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. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 52(4): 279-82.
- Hirai K., To H. 1998. Advances in the understanding of *Coxiella burnetii* infection in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 60(7):781-90.
- Ho T., Htwe K.K., Yamasaki N., Zhang G.Q., Ogawa M., Yamaguchi T., Fukushi, H., Hirai K. 1995. Isolation of *Coxiella burnetii* from dairy cattle and ticks, and some characteristics of the isolates in Japan. *Microbiology and Immunology*. 39(9):663-71.
- Honstetter A, Imbert G, Ghigo E, Gouriet F, Capo C, Raoult D, Mege JL. 2003. Dysregulation of cytokines in acute Q fever: role of interleukin-10 and tumor necrosis factor

- in chronic evolution of Q fever. *The Journal of Infectious Diseases*. 187(6):956-62.
- Honstetter A., Ghigo E., Moynault A., Capo C., Toman R., Akira S., Takeuchi O., Lepidi H., Raoult D., and Mege J.L. 2004. Lipopolysaccharide from *Coxiella burnetii* is involved in bacterial phagocytosis, filamentous actin reorganization, and inflammatory responses through Toll-like receptor 4. *Journal of Immunology*. 172(6): 3695-703.
- Honstetter A, Meghari S, Nunes JA, Lepidi H, Raoult D, Olive D, Mege JL. 2006. Role for the CD28 molecule in the control of *Coxiella burnetii* infection. *Infection and Immunity*. 74(3):1800–8.
- Howe D., Mallavia L.P. 2000. *Coxiella burnetii* exhibits morphological change and delays phagolysosomal fusion after internalization by J774A.1 cells. *Infection and Immunity*. 68(7):3815–21.
- Howe D., Barrows L.F., Lindstrom N.M., Heinzen R. A. 2002. Nitric oxide inhibits *Coxiella burnetii* replication and parasitophorous vacuole maturation. *Infection and Immunity*. 70(9):5140–7.
- Ibrahim I.N., Okabayashi T., Ristiyanto Lestari E.W., Yanase T., Muramatsu Y., Ueno H., Morita C., 1999. Serosurvey of wild rodents for Rickettsioses (spotted fever, murine typhus and Q fever) in Java Island, Indonesia, *European Journal of Epidemiology*. 15(1):89–93.
- Izzo A.A., Marmion B.P., Worswick D.A. 1988. Markers of cell mediated immunity after vaccination with an inactivated, whole-cell Q fever vaccine. *The Journal of Infectious Diseases*. 157(4):781–9.
- Izzo A.A., Marmion B.A. 1993. Variation in interferon-gamma responses to *Coxiella burnetii* antigens with lymphocytes from vaccinated and naturally infected subjects. *Clinical and Experimental Immunology*. 94(3):507–15.
- Jager C., Willems H., Thiele D., Baljer G. 1998. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates. *Epidemiology and Infection*. 120(2):157-64.
- Janbon F., Raoult D., Reynes J., Bertrand, A. 1989. Concomitant human infection due to *Rickettsia conorii* and *Coxiella burnetii*. *The Journal of Infectious Diseases*. 160(2):354-5.
- Kästli P. 1965. Die Milchhygienische Bedeutung des Q-Fiebers. *Milchwissenschaft. Milk Science International*. 91:11-2.
- Kawamoto T., Ogawa M., Kishimoto T., Uchida Y., Kato K., Kawamoto A., Yamashita T. 2002. Three imported cases of acute Q fever after an inspection tour to Australia and New Zealand. *Kansenshogaku Zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*. 76(12):1030–4
- Kazar J., Brezina R., Schramek S., Palanova A., Tvrda B. 1981. Suitability of the microagglutination test for detection of post-infection and post-vaccination Q fever antibodies in human sera. *Acta Virologica*. 25(4):235-40.
- Khavkin T.N. 1977. Pathologo-anatomic and experimental study of the morphology of Q-fever. *Arkhiv Patologii*. 39(2):75–84.
- Khavkin T., Tabibzadeh S.S. 1988. Histologic, immunofluorescence, and electron microscopic study of infectious process in mouse lung after intranasal challenge with *Coxiella burnetii*. *Infection and Immunity*. 56(7):1792-9.
- Kishimoto R.A., Walker J.S. 1976. Interaction between *Coxiella burnetii* and guinea pig peritoneal macrophages. *Infection and Immunity*. 14(2): 416–21.
- Ko W.C., Liang C.C., Chen H.Y., Chuang Y.C., 2000. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* infection in southern Taiwan, *Journal of the Formosan Medical Association*. 99(1):33–8.

- Komiya T., Sadamasu K., Kang M.I., Tsuboshima S., Fukushi H., Hirai K., 2003. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* infections among cats in different living environments. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 65(9):1047–8.
- Kosatsky T. 1984. Household outbreak of Q-fever pneumonia related to a parturient cat. *Lancet*. 2(8417-18):1447-9.
- Koster F.T., Williams J.C., Goodwin J.S. 1985. Cellular immunity in Q fever: specific lymphocyte unresponsiveness in Q fever endocarditis. *The Journal of Infectious Diseases*. 152(6):1283–9.
- Kovacova E., Gallo J., Schramek S., Kazar J., Brezina R. 1987. *Coxiella burnetii* antigens for detection of Q fever antibodies by ELISA in human sera. *Acta Virologica*. 31(3):254-9.
- Kovacova E., Kazar J., 2002. Q fever—still a query and underestimated infectious disease, *Acta Virologica*. 46(4):193–210.
- Krumbiegel E.R., Wisniewski H.J., 1970. Q fever in the Milwaukee area. II. Consumption of infected raw milk by human volunteers. *Archives of Environmental Health*. 21(1):63–5.
- Kruszewska D., Tylewska-Wierzbanska S. 1997. Isolation of *Coxiella burnetii* from bull semen. *Research in Veterinary Science*. 62(3): 299-300.
- La Scola B., Raoult D. 1996. Serological cross-reactions between *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae*, and *Coxiella burnetii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 34(9):2270-74.
- La Scola B., Lepidi H., Raoult D. 1997. Pathologic changes during acute Q fever: influence of the route of infection and inoculum size in infected guinea pigs. *Infection and Immunity*. 65(6):2443-7.
- La Scola B., Raoult D. 2001. Survival of *Coxiella burnetii* within free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Clinical Microbiology and Infection*. 7(2):75-9.
- Lang G.H. 1990. Coxiellosis (Q fever) in animals, CRC press, Boca Raton, pp. 23–48.
- Lang G, Waltner-Toews D, Menzies P. 1991 The seroprevalence of coxiellosis (Q fever) in Ontario sheep flocks. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 55(2):139-42.
- Langley J.M., Marrie T.J., Covert A., Waag D.M., Williams J.C. 1988. Poker players' pneumonia. An urban outbreak of Q fever following exposure to a parturient cat. *The New England Journal of Medicine*. 319(6):354-6.
- Langley J.M., Marrie T.J., Leblanc J.C., Almudevar A., Resch L., Raoult D., 2003. *Coxiella burnetii* seropositivity in parturient women is associated with adverse pregnancy outcomes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 189(1):228–32.
- Lapointe J.M., Gulland F.M., Haines D.M., Barr B.C., Duigan P.J. 1999. Placentitis due to *Coxiella burnetii* in a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 11(6):541-3.
- Laughlin T., Waag D., Williams J., Marrie T. 1991. Q fever: from deer to dog to man. *Lancet*. 337(8742):676-7.
- Lee J.H., Park H.S., Jang W.J., Koh S.E., Park T.K., Kang S.S., Kim B.J., Kook Y.H., Park K.H., Lee S.H., 2004. Identification of the *Coxiella* sp. detected from *Haemaphysalis longicornis* ticks in Korea. *Microbiology and Immunology*. 48(2):125–30.
- Lennette E.H., Clark W.H., Abinanti M.M., Covert, J.M. 1952. Q fever studies: the effect of pasteurization on *Coxiella burnetii* naturally infected milk. *American Journal of Hygiene*. 55(2):246-53.
- Lepe J.A., Guerrero F.J., Ruiz-Calderon A., del Castillo E., Gomez-Salvago S., Jimenez-

- Alonso M.A., Palomo S., Perea R., 1999. The epidemiology of Q fever in the northern area of Huelva, Spain. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 17(2):65–8
- Lerche M. 1965. Lehrbuch der tierärztlichen Milchüberwachung. Berlin und Hamburg, Verlag Paul Parey. (citado em: AFSSA (2004) Fièvre Q: Rapport sur l'évaluation des risques pour la santé publique et des outils de gestion des risques en élevage de ruminants. *Comité d'experts spécialisé « Santé animale »*. www.afssa.fr/ftp/afssa/27623-27624.pdf (acedido em Maio de 2006))
- Lévesque B., De Serres G., Higgins R., D'Halewyn M.A., Artsob H., Grondin J., Major M., Garvie M., Duval B. 1995. Seroepidemiologic study of three zoonoses (leptospirosis, Q fever, and tularemia) among trappers in Québec, Canada. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2(4):496-8.
- Lorenz H., Jager C., Willems H., Baljer G. 1998. PCR detection of *Coxiella burnetii* from different clinical specimens, especially bovine milk, on the basis of DNA preparation with a silica matrix. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(11):4234-7.
- Lührmann A., Roy C.R. 2007. *Coxiella burnetii* inhibits activation of host cell apoptosis through a mechanism that involves preventing cytochrome c release from mitochondria. *Infection and Immunity*. 75(11):5282-9.
- Luoto L., Huebner R.J. 1950. Q fever studies in Southern California : IX. Isolation of Q fever organisms from parturient placentas of naturally infected dairy cows. *Public Health Reports*. 65(16):541-4.
- Lyytikäinen O., Ziese T., Schwartlander B., Matzdorff P., Kuhnhen C., Burger C., Krug W., Petersen L.R., 1997. Outbreak of Q fever in Lohra-Rollshausen, Germany, spring 1996. *Euro Surveillance: European Communicable Disease Bulletin*. 2(2):9–11.
- Manfredi S.T., Rezza G., Scagnelli M., Rigoli R., Rassa M., De Lalla F., Pellizzer G.P., Tramarin A., Bettini C., Zampieri L., Belloni M., Pozza E.D., Marangon S., Marchioretto N., Togni G., Giacobbo M., Todescato A., Binkin, N. 1996. Investigation of a Q-fever outbreak in northern Italy. *European Journal of Epidemiology*. 12(4):403-8.
- Manteca C. 2005. Q fever: metaanalysis and epidemiological survey of seroprevalence in France. *Proceedings of the 6th International Sheep Veterinary Congress*. Hersonissos, Grécia.
- Mantovani A., Benazzi P. 1953. The isolation of *Coxiella burnetii* from *Rhipicephalus sanguineus* on naturally infected dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 122(911):117-20.
- Marmion B.P., Watson W.A. 1961. Q fever and ovine abortion. *Journal of Comparative Pathology*. 71:360-9.
- Marmion BP, Storm PA, Ayres JG, Semendric L, Mathews L, Winslow W, Turra M, Harris RJ. 2005. Long-term persistence of *Coxiella burnetii* after acute primary Q fever. *QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians*. 98(1):7-20.
- Marrie T.J., Van Buren J., Fraser J., Haldane E.V., Faulkner R.S., Williams J.C., Kwan C. 1985. Seroepidemiology of Q fever among domestic animals in Nova Scotia. *American Journal of Public Health*. 75(7):763-6.
- Marrie T.J., Schlech W.F.,I, Williams, J.C., Yates, L. 1986. Q fever pneumonia associated with exposure to wild rabbits. *Lancet*. 1(8478):427-9.
- Marrie T.J. 1988. Q fever, 1979–1987–Nova Scotia. *Canada Diseases Weekly Report*. 14(17):69–70.

- Marrie T.J., Durant H., Williams J.C., Mintz E., Waag D.M. 1988. Exposure to parturient cats: a risk factor for acquisition of Q fever in Maritime Canada. *The Journal of Infectious Diseases*. 158(1):101-8.
- Marrie T.J. 1990. Epidemiology of Q fever. Marrie, T.J. Q fever, vol 1. The disease. 49-70. Boca Raton, Fla, CRC Press.
- Marrie T.J., Embil J., Yates L. 1993. Seroepidemiology of *Coxiella burnetii* among wildlife in Nova Scotia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 49(5):613-5.
- Martinov S.P., Pandarov S., Popov G.V. 1989. Seroepizootology of Q fever in Bulgaria during the last five years. *European Journal of Epidemiology*. 5(4):425-7.
- Masala G., Porcu R., Sanna G., Chessa G., Cillara G., Chisu V., Tola S., 2004. Occurrence, distribution, and role in abortion of *Coxiella burnetii* in sheep and goats in Sardinia, Italy. *Veterinary Microbiology*. 99(3-4):301-5.
- Matthewman L., Kelly P., Hayter D., Downie S., Wray K., Bryson N., Rycroft A., Raoult D. 1997. Exposure of cats in southern Africa to *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever. *European Journal of Epidemiology*. 13(4):477-9.
- Maurin M., Benoliel A.M., Bongrand P., Raoult, D. 1992. Phagolysosomal alkalization and the bactericidal effect of antibiotics: the *Coxiella burnetii* paradigm. *The Journal of Infectious Diseases*. 166(5):1097-102.
- Maurin M., Raoult D. 1999. Q fever. *Clinical Microbiological Reviews*. 12(4):518-53.
- McCaul T.F., Williams J.C. 1981. Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *Journal of Bacteriology*. 14(3):1063-76.
- McCaul T.F., Dare A. J., Gannon J. P., and Galbraith A. J. 1994. In vivo endogenous spore formation by *Coxiella burnetii* in Q fever endocarditis. *Journal of Clinical Pathology*. 47:978-81.
- McDiarmid L., Petney T., Dixon B., Andrews R., 2000. Range expansion of the tick *Amblyomma triguttatum triguttatum*, an Australian vector of Q fever. *International Journal for Parasitology*. 30(7):791-3.
- Mege J.L., Maurin M., Capo C., Raoult D. 1997. *Coxiella burnetii*: the 'query' fever bacterium. A model of immune subversion by a strictly intracellular microorganism. *FEMS Microbiological Reviews*. 19(4):209-17.
- Melnicakova J., Lukacova M., Howe, D., Heinzen, R.A., Barak I. 2003. Identification of *Coxiella burnetii* RpoS-dependent promoters. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 990: 591-5.
- Meskini M., Beati L., Benslimane A., Raoult, D. 1995. Seroepidemiology of rickettsial infections in Morocco. *European Journal of Epidemiology*. 11(6):655-60.
- Miller J.D., Curns A.T., Thompson H.A. 2004. A growth study of *Coxiella burnetii* Nine Mile Phase I and Phase II in fibroblasts. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 42(3):291-7.
- Muramatsu Y., Yanase T., Okabayashi T., Ueno H., Morita C. 1997. Detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay combined with a novel sample preparation method. *Applied and environmental microbiology*. 63(6):2142-6.
- Moos A, Hackstadt T. 1987 Comparative virulence of intra- and interstrain lipopolysaccharide variants of *Coxiella burnetii* in the guinea pig model. *Infection and Immunity*. 55(5):1144-50.

- Musso D., Raoult D. 1997. Serological cross-reactions between *Coxiella burnetii* and *Legionella micdadei*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 4(2):208-12.
- Nelder M.P., Lloyd J.E., Loftis A.D., Reeves W.K. 2008. *Coxiella burnetii* in wild-caught filth flies. *Emerging Infectious Diseases*. 14(6):1002-4.
- Nermut M.V., Schramek S., Brezina R. 1968. Electron microscopy of *Coxiella burnetii* phase I and II. *Acta Virologica*. 12(5):446-52.
- Nguyen S.V., Otsuka H., Zhang, G.Q., To, H., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Noma, A., Hirai, K. 1996. Rapid method for detection of *Coxiella burnetii* antibodies using high-density particle agglutination. *Journal of Clinical Microbiology*. 34(12):2947-51.
- Norlander L. 2000. Q fever epidemiology and pathogenesis. *Microbes and Infection*. 2(4):417-424.
- Numazaki K., Ueno H., Yokoo K., Muramatsu Y., Chiba S., Morita C., 2000. Detection of serum antibodies to *Bartonella henselae* and *Coxiella burnetii* from Japanese children and pregnant women, *Microbes and Infection*. 2(12):1431-4.
- OIE (2004), Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 2.2.10 – *Q fever*. <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A-00049.htm> (acedido em 15 de Novembro de 2007)
- Oporto B, Barandika JF, Hurtado A, Aduriz G, Moreno B, Garcia-Perez AL. 2006. Incidence of ovine abortion by *Coxiella burnetii* in northern Spain. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1078:498-501.
- Ormsbee R. 1952. The growth of *Coxiella burnetii* in embryonated eggs. *Journal of bacteriology*. 63(1):73.
- Ormsbee R.A., Bell E.J., Lackman D.B., Tallent G. 1964. The influence of phase on the protective potency of Q fever vaccine. *Journal of Immunology*. 92:404-12.
- Palmer N.C., Kierstead M., Key D.W., Williams J.C., Peacock M.G., Vellend H. 1983. Placentitis and abortion in sheep and goats in Ontario caused by *Coxiella burnetii*. *The Canadian Veterinary Journal*. 24(2):60-1.
- Parker R.R., Davis G.E. 1938. A filter-passing infectious agent isolated from ticks. Transmission by *Dermacentor andersoni*. *Public Health Reports*. 53:2267-9.
- Parker NR, Barralet JH, Bell AM. 2006. Q fever. *The Lancet*. 367(9511):679-88.
- Pebody R.G., Wall P.G., Ryan M.J., Fairley C., 1996. Epidemiological features of *Coxiella burnetii* infection in England and Wales: 1984 to 1994. *Communicable Disease Report. CDR Review*. 6(9):R128-32.
- Penttila I.A., Harris R.J., Storm P., Haynes D., Worswick D.A., Marmion B.P. 1998. Cytokine dysregulation in the post-Q-fever fatigue syndrome. *QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians*. 91(8):549-60.
- Perrin T.K., Bengtson I.A. 1942. The histopathology of experimental Q fever in mice. *Public health reports*. 57:790-4.
- Peter O., Dupuis G., Burgdorfer W., Peacock M. 1985. Evaluation of the complement fixation and indirect immunofluorescence tests in the early diagnosis of primary Q fever. *European Journal of Clinical Microbiology*. 4(4):394-6.
- Peter O., Dupuis G., Bee D., Lüthy R., Nicolet J., Burgdorfer W. 1988. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of chronic Q fever. *Journal of Clinical Microbiology*. 26(10):1978-82.

- Philip C.B. 1948. Observations on experimental Q fever. *The Journal of Parasitology*. 34(6):457-64.
- Pinsky R.L., Fishbein D.B., Greene C.R., Gensheimer K.F. 1991. An outbreak of cat-associated Q fever in the United States. *The Journal of Infectious Diseases*. 164(1):202-4.
- Plommet M., Capponi M., Gestin J., Renoux G. 1973. Fièvre Q expérimentale des bovins. *Annales de Recherches Vétérinaires. Annals of Veterinary Research*. 4(2):325-46.
- Potasman I., Rzotkiewicz S., Pick N., Keysary A., 2000. Outbreak of Q fever following a safari trip. *Clinical Infectious Diseases*. 30(1):214-5.
- Quinn P.J., Carter M.E., Markey B., Carter G.R. 1994. Bacterial pathogens : microscopy, culture and identification. *Clinical Veterinary Microbiology*. 21-30. Wolfe Publishing, Mosby -Yeay Book Europe Limited.
- Reeves W.K., Loftis A.D., Priestley R.A., Wills W., Sanders F., Dasch G.A. 2005. Molecular and biological characterization of a novel Coxiella-like agent from *Carios capensis*, in Rickettsioses: from Genome to Proteome. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1063:343-5.
- Raoult D., Vestris G., Enea M. 1990. Isolation of 16 strains of *Coxiella burnetii* from patients by using a sensitive centrifugation cell culture system and establishment of the strains in HEL cells. *Journal of Clinical Microbiology*. 28(11):2482-2484.
- Raoult D, Marrie T. 1995. Q fever. *Clinical infectious diseases*. 20(3):489-95.
- Raoult D., Tissot-Dupont H., Foucault C., Gouvernet J., Fournier P.E., Bernit E., Stein A., Nesri M., Harle J.R., Weiller P.J. 2000. Q fever 1985-1998. Clinical and epidemiologic features of 1,383 infections. *Medicine (Baltimore)* 79(2):109-23.
- Raska K, Syrucek L. 1956. Q fever in domestic and wild birds. *Bulletin of the World Health Organization*. 15(1-2):329-37.
- Reintjes R., Hellenbrand W., Dusterhaus A., 2000. Q-fever outbreak in Dortmund in the summer of 1999. Results of an epidemiological outbreak study. *Gesundheitswesen (Bundesverband der Ärzte des Öffentlichen Gesundheitsdienstes (Germany))* 62(11):609-14.
- Rey D., Obadia Y., Tissot-Dupont H., Raoult D., 2000. Seroprevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* among pregnant women in South Eastern France. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*. 93(2):151-6.
- Rousset E., Durand B., Berri M., Dufour P., Prigent M., Russo P., Delcroix T., Touratier A., Rodolakis A., Aubert M. 2007. Comparative diagnostic potential of three serological tests for abortive Q fever in goat herds. *Veterinary Microbiology*. 6;124(3-4):286-97.
- Rodolakis A. 2006. Q fever, state of art :Epidemiology, diagnosis and prophylaxis. *Small Ruminant Research* 62:121-4.
- Rodolakis A., Berri M., Héchard C., Caudron C., Souriau A., Bodier C.C., Blanchard B., Camuset P., Devillechaise P., Natorp J.C., Vadet J.P., Arricau-Bouvery N. 2007. Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine, and ovine herds. *Journal of Dairy Science*. 90(12):5352-60.
- Romano P.S., Gutierrez M.G., Berón W., Rabinovitch M., Colombo M.I. 2007. The autophagic pathway is actively modulated by phase II *Coxiella burnetii* to efficiently replicate in the host cell. *Cellular Microbiology*. 9(4):891-909.
- Russell-Lodrigue K.E., Zhang G.Q., McMurray D.N., Samuel J.E. 2006. Clinical and pathologic changes in a guinea pig aerosol challenge model of acute Q fever. *Infection and Immunity*. 74(11):6085-91.

- Russo P., Rodolakis A., Nettleton P. 1997. Infection à *Coxiella burnetii* ou fièvre Q. *Manuel pratique de diagnostic de laboratoire des avortements infectieux des petits ruminants*. 103-114. Casablanca, Maroc, L'Espace Vétérinaire.
- Rustscheff S., Norlander L., Macellaro A., Sjostedt A., Vene S., Carlsson M. 2000. A case of Q fever acquired in Sweden and isolation of the probable ethiological agent, *Coxiella burnetii* from an indigenous source. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 32(6):605-7.
- Sadecky E., Brezina R., Kazar J., Urvolgyi J. 1975a. Immunization against Q-fever of naturally infected dairy cows. *Acta Virologica*. 19(6):486-8.
- Sadecky E., Brezina R., Michalovic M. 1975b. Vaccination of cattle against Q-fever. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology, and Immunology*. 19(2):200-6.
- Sadecky E., Brezina R. 1977. Vaccination of naturally infected ewes against Q-fever. *Acta Virologica*. 21(1):89.
- Salmon M.M., Howells B., Glencross E.J., Evans A.D., Palmer S.R. 1982. Q fever in an urban area. *The Lancet* 1(8279):1002-4.
- Sampere M., Font B., Font J., Sanfeliu I., Segura F., 2003. Q fever in adults: review of 66 clinical cases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 22(2):108-10.
- Samuel J.E., Kiss K., Varghees S. 2003. Molecular pathogenesis of *Coxiella burnetii* in a genomics era. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 990:653-63.
- Sánchez J., Souriau A., Buendía A.J., Arricau-Bouvery N., Martínez C.M., Salinas J., Rodolakis A., Navarro J.A. 2006. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: a histopathological and immunohistochemical study. *Journal of Comparative Pathology*. 135(2-3):108-15.
- Sanford S.E., Josephson G.K., MacDonald A. 1994. *Coxiella burnetii* (Q fever) abortion storms in goat herds after attendance at an annual fair. *The Canadian Veterinary Journal. La Revue Vétérinaire Canadienne*. 35(6):376-8.
- Santoro D., Giura R., Colombo M.C., Antonelli P., Gramegna M., Gandola O., Gridavilla G., 2004. Q fever in Como, northern Italy. *Emerging Infectious Diseases*. 10(1):159-160.
- Sofia A.S., Bacellar F., França A. 2007. Febre Q: revisão de conceitos. *Medicina Interna*. 14(2):90-9.
- Schaal E., Schaaf J. 1969. [Experiences in successful elimination of Q-fever in cattle stock]. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B*. 16(9):818-31.
- Schaal E. 1977. [Occurrence of *Coxiella burnetii* in foodstuffs in animal origin]. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*. 90(19): 376-9.
- Schaal E.H. 1982. [Udder colonization with *Coxiella burnetii* in cattle Q fever]. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*. 89(10):411-4.
- Schelling E., Diguimbaye C., Daoud S., Nicolet J., Boerlin P., Tanner M., Zinsstag J., 2003. Brucellosis and Q-fever seroprevalences of nomadic pastoralists and their livestock in Chad, *Preventive Veterinary Medicine*. 61(4):279-93.
- Schmeer N., Muller P., Langel J., Krauss H., Frost J.W., Wieda J. 1987. Q fever vaccines for animals. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A*. 267(1):79-88.
- Schmeer N., Müller H.P., Baumgärtner W., Wieda J., Krauss H. 1988. Enzyme-linked immunosorbent fluorescence assay and high-pressure liquid chromatography for analysis of humoral immune responses to *Coxiella burnetii* proteins. *Journal of Clinical Microbiology*.

26(12):2520-5.

Scott G. H. e Williams J. C. 1990. Susceptibility of *Coxiella burnetii* to chemical disinfectants. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 590:291–6.

Seigneurin R., Seigneurin J.M. 1968 [The crow of the Alps is infected by *Rickettsia burnetii*]. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*. 152(1):5-7.

Sekeyova Z., Thiele D., Krauss H., Karo M., Kazar J. 1996. Monoclonal antibody based differentiation of *Coxiella burnetii* isolates. *Acta Virologica*. 40(3):127-32.

Sekeyova Z., Roux V., Raoult D. 1999. Intraspecies diversity of *Coxiella burnetii* as revealed by com1 and mucZ sequence comparison. *FEMS Microbiology Letters*. 180(1):61-7.

Serbežov V.S., Kazar J., Novkirishki V., Gatcheva N., Kovacova E., Voynova V., 1999. Q fever in Bulgaria and Slovakia, *Emerging Infectious Diseases*. 5(3):388–94.

Seshadri R., Hendrix L.R., Samuel J.E. 1999. Differential expression of translational elements by life cycle variants of *Coxiella burnetii*. *Infection and Immunity*. 67(11):6026-33.

Seshadri R., Paulsen I.T., Eisen J.A., Read T.D., Nelson K.E., Nelson W.C., Ward N.L., Tettelin H., Davidsen T.M., Beanan M.J., Deboy R.T., Daugherty S.C., Brinkac L.M., Madupu R., Dodson R.J., Khouri H.M., Lee K.H., Carty H.A., Scanlan D., Heinzen R.A., Thompson H.A., Samuel J.E., Fraser C.M., Heidelberg J.F., 2003. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9): 5455– 60.

Seshadri R., Samuel J. 2005. Genome analysis of *Coxiella burnetii* species e insights into pathogenesis and evolution and implications for biodefense. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1063:442-50.

Shannon J.G., Howe D., Heinzen R.A. 2005. Virulent *Coxiella burnetii* does not activate human dendritic cells: role of lipopolysaccharide as a shielding molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(24):8722–7.

Sidwell R.W., Thorpe B.D., Gebhardt L.P. 1964a. Studies On Latent Q Fever Infections. I. Effects Of Whole Body X-Irradiation Upon Latently Infected Guinea Pigs, White Mice And Deer Mice. *American Journal of Hygiene*. 79:113-24.

Sidwell R.W., Thorpe B.D., Gebhardt L.P. 1964b. Studies of latent Q fever infections. II Effects of multiple cortisone Injections. *American Journal of Hygiene*. 79:320-7.

Sidwell R.W., Gebhardt L.P. 1966. Studies of latent Q fever infections. 3. Effects of parturition upon latently infected guinea pigs and white mice. *American Journal of Epidemiology*. 84(1):132-7.

Sipka M. 1959. Überleben von *Rickettsia burnetii* i in Käse. *The Veterinary Bulletin*. 29:112.

Smith, D.J.W. 1940. Studies on the epidemiology of Q fever.I. The transmission of Q fever by the tick *Haemaphysalis bispinosa* . *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*. 18:103-6.

Smith, D.J.W. 1941. Studies on the epidemiology of Q fever. VIII. The transmission of Q fever by the tick *Rhipicephalus sanguineus*. *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*. 19:119-22.

Speelman D.W., 1982. Q fever: a study of 111 consecutive cases. *The Medical Journal of Australia*. 1(13):547–53.

Splino M., Beran J., Chlibek R., 2003. Q fever outbreak during the Czech Army deployment in Bosnia, *Military Medicine*. 168(10):840–2.

- Spyridaki I., Psaroulaki A., Aransay A., Scoulica E., Tselentis Y. 2000. Diagnosis of quinolone-resistant *Coxiella burnetii* strains by PCR-RFLP. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 14(2):59-63.
- Spyridaki I., Psaroulaki A., Loukaides F., Antoniou M., Hadjichristodolou C., Tselentis Y., 2002. Isolation of *Coxiella burnetii* by a centrifugation shell-vial assay from ticks collected in Cyprus: detection by nested polymerase chain reaction (PCR) and by PCR-restriction fragment length polymorphism analyses, *The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*. 66(1):86-90.
- Stein A., Saunders N.A., Taylor A.G., Raoult D. 1993. Phylogenic homogeneity of *Coxiella burnetii* strains as determined by 16S ribosomal RNA sequencing. *FEMS Microbiology Letters*. 113(3):339-44.
- Stein A., Raoult D. 1999. Pigeon pneumonia in provence: a bird-borne Q fever outbreak. *Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 29(3):617-20.
- Stein A., Lepidi H., Mege J.L., Marrie T.J., Raoult D. 2000. Repeated pregnancies in BALB/c Mice infected with *Coxiella burnetii* cause disseminated infection, resulting in stillbirth and endocarditis. *The Journal of Infectious Diseases*. 181(1):188-94.
- Stein A., Louveau C., Lepidi H., Ricci F., Baylac P., Davoust B., Raoult D. 2005. Q fever pneumonia: virulence of *Coxiella burnetii* pathovars in a murine model of aerosol infection. *Infection and Immunity*. 73(4):2469-77.
- Steiner H.A., Raveh D., Rudensky B., Paz E., Jerassi Z., Schlesinger Y., Yinnon A.M., 2001. Outbreak of Q fever among kitchen employees in an urban hospital. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 20(12):898-900.
- Stemmler M., Meyer H. 2002. Rapid and specific detection of *Coxiella burnetii* by LightCycler PCR. Reisch, U., Wittwer, C., Cockerill, F. *Methods and Applications. Microbiology and Food Analysis*. 149-154. Berlin, Springer Verlag.
- Stevens H., Beeres M.P., Meijer J.G., Koeman J., van Kregten E., Bartelink A.K., 2000. Q fever: not just in sheep. *Nederlands tijdschrift Voor Geneeskunde*. 144(27):1297-300.
- Tainturier, D. 1987. Métrites en série chez la vache provoquées par la fièvre Q. *Recueil de Médecine Vétérinaire*. 163:195-8.
- Takahashi H., Tokue Y., Kikuchi T., Kobayashi T., Gomi K., Goto I., Shiraishi H., Fukushi H., Hirai K., Nukiwa T., Watanabe A., 2004. Prevalence of community-acquired respiratory tract infections associated with Q fever in Japan. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 48(4):247-52.
- Tatsumi N., Baumgartner A., Qiao Y., Yamamoto I., Yamaguchi K. 2006. Detection of *Coxiella burnetii* in market chicken eggs and mayonnaise. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1078:502-5.
- Tigertt W.D., Benenson A.S., Gochenour W.S. 1961. Airborne Q fever. *Bacteriological Reviews*. 25:285-3.
- Tissot-Dupont H., Torres S., Nezri M., Raoult D. 1999. Hyperendemic focus of Q fever related to sheep and wind. *American Journal of Epidemiology*. 150(1):67-74.
- Tissot-Dupont H., Amadei M.A., Nezri M., Raoult, D. 2004. Wind in November - Q fever in December. *Emerging Infectious Diseases*. 10(7):1264-9.
- Thibon M., Villiers V., Souque P., Dautry-Varsat A., Duquesnel R., Ojcius D.M. 1996. High

- incidence of *Coxiella burnetii* markers in a rural population in France. *European Journal of Epidemiology*. 12(5):509-13.
- Thiele D., Karo M., Krauss H. 1992. Monoclonal antibody based capture ELISA/ELIFA for detection of *Coxiella burnetii* in clinical specimens. *European Journal of Epidemiology*. 8(4):568-74.
- Thiele D., Willems H., Kopf G., Krauss H. 1993. Polymorphism in DNA restriction patterns of *Coxiella burnetii* isolates investigated by pulsed field gel electrophoresis and image analysis. *European Journal of Epidemiology*. 9(4):419-25.
- Thomas D.R., Salmon R.L., Kench S.M., Meadows D., Coleman T.J., Morgan-Capner P., Morgan K.L. 1994. Zoonotic illness: determining risks and measuring effects of the association between current animal exposure and a history of illness in a well characterized rural population. *Journal of Epidemiology and Community Health*. 48(2):151-5.
- Thomas D.R., Treweek L., Salmon R.L., Kench S.M., Coleman T.J., Meadows D., Morgan-Capner P., Caul E.O. 1995. The risk of acquiring Q fever on farms: a seroepidemiological study. *Occupational and Environmental Medicine*. 52(10):644-7.
- Thrusfield M. 2007. *Veterinary Epidemiology*, 3ª edição. WileyBlackwell.
- To H., Kako N., Zhang G.Q., Otsuka H., Ogawa M., Ochiai O., Nguyen S.V., Yamaguchi T., Fukushi H., Nagaoka N., Akiyama M., Amano K., Hirai K. 1996. Q fever pneumonia in children in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*. 34(3):647-51.
- To H., Htwe K.K., Kako N., Kim H.J., Yamaguchi T., Fukushi H., Hirai K. 1998. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle with reproductive disorders. *The Journal of Veterinary Medical Science / The Japanese Society of Veterinary Science*. 60(7): 859-61.
- Tokarevich N.K., Schramek S., Daiter A.B. 1990. Indirect haemolysis test in Q-fever. *Acta Virologica*. 34(4):358-60.
- Tujulin E., Lilliehook B, Macellaro A, Sjostedt A, Norlander L. 1999. Early cytokine induction in mouse P388D1 macrophages infected by *Coxiella burnetii*. *Veterinary Immunology and Immunophatology*. 68:(2-4)159-68.
- Turco J., Thompson H. A., Winkler H. 1984. Interferon- γ inhibits growth of *Coxiella burnetii* in mouse fibroblasts. *Infection and Immunity*. 45(3):781-3.
- Uhaa I.J., Fishbein D.B., Olson J.G., Rives C.C., Waag D.M., Williams J.C. 1994. Evaluation of specificity of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human Q fever. *Journal of Clinical Microbiology*. 32(6):1560-5.
- Vodkin M.H., Williams J.C., Stephenson E.H. 1986. Genetic heterogeneity among isolates of *Coxiella burnetii*. *Journal of General Microbiology*. 132(2):455-63.
- Vogel J.P. 2004. Turning a tiger into a house cat: using *Legionella pneumophila* to study *Coxiella burnetii*. *Trends in Microbiology* 12(3):103-5.
- Voth D.E., Heinzen R.A. 2007. Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of *Coxiella burnetii*. *Cellular Microbiology*. 9(4):829-40.
- Voth D.E., Howe D, Heinzen R.A. 2007. *Coxiella burnetii* inhibits apoptosis in human THP-1 cells and monkey primary alveolar macrophages. *Infection and Immunity*. 75(9):4263-71.
- Waag D., Chulay J., Marrie T., England M., Williams J. 1995. Validation of an enzyme immunoassay for serodiagnosis of acute Q fever. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 14(5):421-7.

- Waag D.M. 2007. *Coxiella burnetii*: Host and bacterial responses to infection. *Vaccine*. 16;25(42):7288-95.
- Waldhalm D.G., Stoenner H.G., Simmons R.E., Thomas L.A. 1978. Abortion associated with *Coxiella burnetii* infection in dairy goats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 173(12):1580-1.
- Webster J.P., Lloyd G., Macdonald D.W. 1995. Q fever (*Coxiella burnetii*) reservoir in wild brown rat (*Rattus norvegicus*) populations in the UK. *Parasitology*. 110(1):31-5.
- Weisburg W.G., Dobson M.E., Samuel J.E., Dasch G.A., Mallavia L.P., Baca O., Mandelco L., Sechrest J.E., Weiss E., Woese C.R. 1989. Phylogenetic diversity of the Rickettsiae. *Journal Of Bacteriology*, 171(8):4202-6.
- Welsh H.H., Lennette E.H., Abinanti F.R., Winn J.F. 1951. Q fever in California. IV. Occurrence of *Coxiella burnetii* in the placenta of naturally infected sheep. *Public Health Reports*. 66(45):1473-7.
- Welsh H.H., Lennette E.H., Abinanti F.R., Winn J.F. 1957. Air-borne transmission of Q fever: the role of parturition in the generation of infective aerosols. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 70:528-35.
- Wen B.H., Yu S.R., Yu G.Q., Li Q.J., Zhang X. 1991. Analysis of proteins and lipopolysaccharides from Chinese isolates of *Coxiella burnetii* with monoclonal antibodies. *Acta Virologica*. 35(6):538-544.
- Wiebe M.E., Burton P.R., Shankel D.M. 1972. Isolation and characterization of two cell types of *Coxiella burnetii* phase I. *Journal of bacteriology*. 110(1):368-77.
- Willems H., Thiele D., Glas-Adollah-Baik K.M., Krauss H. 1992. Immunoblot technique for Q fever (technical note). *European Journal of Epidemiology*. 8(1):103-7.
- Williams J.C., Thomas L.A., Peacock M.G. 1986. Identification of phase-specific antigenic fractions of *Coxiella burnetii* by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 24(6):929-34.
- Williams J.C., Peacock M.G., Waag D.M., Kent G., England M.J., Nelson G., Stephenson E. H. 1993. Vaccines against coxiellosis and Q fever. Development of a chloroform-methanol residue subunit of phase I *Coxiella burnetii* for the immunization of animals. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 653:88-111.
- Wilson K.H., Blitchington R., Shah P., McDonald G., Gilmore R.D., Mallavia L.P. 1989. Probe *rickettsii* rRNA amplified with polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 27(12): 2692-6.
- Wittenbrink M. M., Gefaller S., Failing K., Bisping W. 1994. [The effect of herd and animal factors on the detection of complement-binding antibodies against *Coxiella burnetii* in cattle]. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*. 107(6):185-1.
- Woernle H., Limouzin C., Muler K., Durand M.P. 1985. La fièvre Q bovine. Effet de la vaccination et de l'antibiothérapie sur l'évolution clinique et l'excrétion de *Coxiella burnetii* dans le lait. *Bulletin De L'academie Veterinaire De France*. 58:91-100.
- Worswick D., Marmion B.P. 1985. Antibody responses in acute and chronic Q fever and in subjects vaccinated against Q fever. *Journal of Medical Microbiology*. 19(3):281-96.
- Yanase T., Muramatsu Y., Ueno H., Morita C. 1997. Seasonal variations in the presence of antibodies against *Coxiella burnetii* in dairy cattle in Hokkaido, Japan. *Microbiology and Immunology*. 41(2):73-5.
- Yanase T., Muramatsu Y., Inouye I., Okabayashi T., Ueno H., Morita C. 1998. Detection of

- Coxiella burnetii* from dust in a barn housing dairy cattle. *Microbiology and Immunology*. 42(1):51-3.
- Yohannes K., Roche P., Blumer C., Spencer J., Milton A., Bunn C., Gidding H., Kirk M., Della-Porta T., 2004. Australia's notifiable diseases status, 2002: Annual report of the National Notifiable Diseases Surveillance System. *Communicable Diseases Intelligence*. 28(1):6-68.
- Zamboni D.S., Mortara R.A., Freymuller E., Rabinovitch M. 2002. Mouse resident peritoneal macrophages partially control in vitro infection with *Coxiella burnetii* phase II. *Microbes and Infection*. 4(6):591-8.
- Zamboni D.S. e Rabinovitch M. 2003. Nitric oxide partially controls *Coxiella burnetii* phase II infection in mouse primary macrophages. *Infection and Immunity*. 71(3):1225-33.
- Zeman D.H., Kirkbride C.A., Leslie-Steen P, Duimstra JR. 1989. Ovine abortion due to *Coxiella burnetii* infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1(2):178-80.
- Zhang G.Q., To H., Yamaguchi T., Fukushi H., Hirai K. 1997. Differentiation of *Coxiella burnetii* by sequence analysis of the gene (com1) encoding a 27-kDa outer membrane protein. *Microbiology and Immunology*. 41(11):871-7.
- Zhang G., Kiss K., Seshadri R., Hendrix L.R., Samuel J.E. 2004. Identification and cloning of immunodominant antigens of *Coxiella burnetii*. *Infection and Immunity*. 72(2):844-52.