

**LUÍS FILIPE RAPOSO DUARTE**

**PESQUISA DE *COXIELLA BURNETII* EM ANIMAIS  
DE COMPANHIA EM CONTEXTO URBANO**

**Orientadora:** Ana Sofia Pereira dos Santos

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa**

**2014**

**LUÍS FILIPE RAPOSO DUARTE**

**PESQUISA DE *COXIELLA BURNETII* EM ANIMAIS  
DE COMPANHIA EM CONTEXTO URBANO**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau  
de Mestre em Medicina Veterinária no curso de  
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária  
conferido pela Universidade Lusófona de  
Humanidades e Tecnologias

Orientadora: Doutora Ana Sofia Pereira dos Santos  
Coorientadora: Prof. Doutora Maria Margarida  
Ferreira Alves

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa**

**2014**

*A ausência de evidência não significa evidência  
da ausência*

*Carl Sagan*

## **Agradecimentos:**

Agradeço ao Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, nomeadamente ao senhor presidente Professor Doutor José Pereira Miguel, por permitir a realização do trabalho laboratorial, através da parceria entre o projeto PTDC/SAU-SAP/115266/2009 e a Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Agradeço ao Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas Dr. Francisco Cambournac, na pessoa da Doutora Sofia Nuncio, pela oportunidade de usufruir das instalações e de todos os equipamentos necessários à realização da parte laboratorial, deste trabalho.

Agradeço à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) pelo apoio financeiro à realização do trabalho laboratorial através do projeto “Febre Q – do diagnóstico à investigação eco-epidemiológica de *Coxiella burnetii* no contexto da infeção humana (ref. <sup>a</sup> PTDC/SAU-SAP/115266/2009)” de que o presente estudo é parte integrante, pelo suporte de todas as despesas de bancada.

Agradeço à Doutora Ana Sofia Santos por todo o apoio e ajuda no desenvolvimento do trabalho laboratorial, no apoio incondicional nos momentos de fraqueza aquando dos maus resultados, nas tentativas fracassadas de arranjar amostras, no desenvolvimento da parte escrita da tese e por toda a calma e palavras de incentivo transmitidas durante todo o processo. Um agradecimento infinito por todo o apoio, que ultrapassou sem qualquer dúvida o papel de orientadora ao qual se propôs. Um bem haja por todos os conhecimentos que me transmitiu e por ser um exemplo de excelência profissional e pessoal.

Agradeço à Doutora Margarida Alves, pela coorientação de todo este processo e trabalho desenvolvido em parceria com a Doutora Ana Sofia Santos. Pelo incentivo de abraçar este projeto independentemente das contrapartidas, nomeadamente a dificuldade de chegar aos criadores e do receio da componente laboratorial.

Agradeço ao Hospital Veterinário da FMV-ULHT, em especial, às enfermeiras Carla Sousa e Maria Inês Lameira e à Joana Pereira por toda a paciência, apoio e disponibilidade em recolher as amostras e em preencher os inquéritos referentes ao animais, mesmo quando o tempo escasseava dado o excesso de trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e a toda a sua equipa técnica, em especial à Doutora Margarida Alves, pelo apoio e ajuda na manipulação das amostras.

Agradeço à equipa do Hospital Veterinário das Mercês, em especial ao Dr. Hugo Oliveira, pela disponibilidade, colaboração, interesse e incentivo a investigações de excelência.

Agradeço à equipa do Centro Veterinário Coolvet, em especial à Dr.<sup>a</sup> Francisca Costa e Almeida pela colaboração, disponibilidade e contributo profissional e pessoal.

Agradeço à equipa do Centro Veterinário Vetalcácer pela colaboração, disponibilidade e acolhimento nas suas instalações. Em especial ao Dr. Hugo Ferreira pela amizade e incentivo ao término desta etapa, bem como toda a partilha de conhecimentos.

Agradeço a todos os criadores que aceitaram colaborar com o estudo, que por motivos profissionais terão que permanecer no anonimato. No entanto, e apesar de serem referidos como “criadores” não deixam de ter um papel de extrema relevância e o meu profundo agradecimento, uma vez que, os “nãos” foram bem mais frequentes que os “sins”.

Agradeço a toda a equipa do Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas Dr. Francisco Cambournac por todo o apoio e compreensão durante todo o processo de trabalho laboratorial. Em especial à Dr.<sup>a</sup> Teresa pela imprescindível ajuda aquando da realização da técnica imunofluorescência, bem como todas as palavras de incentivo dadas durante todo o processo.

Agradeço ao Doutor Pedro Faísca pela orientação do estudo e direccionamento na recolha das amostras na população em estudo.

Agradeço ao Mestre Ricardo Assunção por toda a ajuda, compreensão, disponibilidade e paciência durante todo o processo na escolha de estágio curricular.

Agradeço ao Dr. Mauro Bragança por toda a ajuda e disponibilidade dada na estruturação da investigação.

Agradeço ao Mestre David Morais por toda a disponibilidade, paciência e profissionalismo dados durante a análise de dados estatisticamente.

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais e mana, pilares imprescindíveis durante todo o percurso académico. Sem eles a realização deste percurso não teria sido possível. Agradeço por me ter proporcionado desde cedo uma educação de excelência, dentro dos possíveis, de todo o esforço e de todos os sacrifícios para que tal acontecesse. Resta-me agradecer a eles por tudo o que sou hoje e por me manterem num seio familiar coeso e feliz. Obrigado por serem sempre eles a apoiarem-me em tudo e por serem Eles o meu fio condutor.

Agradeço à Cinha por todo o apoio dado durante todo o percurso académico, em especial pelo companheirismo e amizade incondicional dados sempre que necessário. Obrigado por me ter feito primar sempre pela excelência e querer sempre mais e melhor.

Agradeço à Maria Santos pelo importante papel desempenhado durante todo o percurso académico e pessoal. Pelas palavras de incentivo, pelo colo incondicional e pelo abraço amigo, aberto a que momento fosse para confortar qualquer dissabor ocorrido.

Agradeço à Catarina e à Cristiana pela amizade, apoio e companheirismo oferecidos no final deste processo. Pelos momentos de partilha e entreajuda sempre que necessário durante todo o processo de escrita da tese.

Agradeço a todos os meus colegas e amigos pela partilha e amizade oferecidos durante todo o processo académico. Em especial ao Márcio, Fernanda, Juliana, Joana e Ana por me terem feito acreditar que era possível terminar mais uma etapa.

Agradeço a todos os que colaboraram de forma direta ou indireta na realização deste estudo, sem eles a realização do mesmo não teria sido possível. Um bem haja a todos.

## Resumo

A infecção por *Coxiella burnetii* é considerada uma zoonose emergente ou reemergente, por toda a Europa. Estudos epidemiológicos e clínicos apontam para um aumento de casos de febre Q, em especial em meio rural, tendo como principal fonte de infecção as espécies pecuárias, nomeadamente os ruminantes. No entanto, a possibilidade de existir uma fonte de infecção alternativa é cada vez maior, em especial em infeções adquiridas em meio urbano, nas quais os animais de companhia, cães e gatos, podem ter um papel chave pelo estreito contacto que habitualmente têm com os humanos.

Neste trabalho pretendeu-se averiguar se *C. burnetii* é uma bactéria prevalente, em animais de companhia em contexto urbano. Para tal recolheram-se amostras de 173 cães e 102 gatos, do sexo feminino, para pesquisa de ADN de *C. burnetii* e anticorpos anti-*C. burnetii* em fase I e II. Recorreu-se à técnica de PCR *nested* para pesquisa de ADN em úteros (N=176), sangue (N=167), zaragatoas vaginais (N= 68), placentas (N= 24) e amostras atípicas (N=4), tendo o resultados sido negativo na população em estudo. Os anticorpos anti-*C. burnetii* foram pesquisados em amostras de plasma (N= 149) com recurso à técnica de IFA utilizando um limiar de positividade de 50, tendo-se obtido resultados positivos em três cães (4,3%) e seis gatos (7,5%) com títulos a variar entre <50 - 800 em fase I e <50 – 400 em fase II.

Em Portugal, este estudo é pioneiro no que diz respeito à pesquisa de ADN de *C. burnetii* em animais de companhia. Relativamente ao estudo serológico, a prevalência encontrada é comparável à observada no único trabalho existente sobre este tema e realizado em cães, reforçando os resultados do rastreio molecular. Em resumo, esta investigação indica que a exposição a *C. burnetii* é baixa na população em estudo, apontando para que o papel dos cães e gatos na infecção humana em contexto urbano possa ser negligenciável.

**Palavras chave:** *Coxiella burnetii*; Cães; Gatos; PCR; IFA;

## Abstract

*Coxiella burnetii* infection is considered an emerging or re-emerging zoonosis throughout Europe. Epidemiological studies and case reports point to an increase in Q fever cases especially in rural areas, where livestock species are the main source of infection. However, the possibility of an alternative source of infection is increasing, particularly for infections acquired in urban environment, in which companion animals, dogs and cats, may have a key role due to the close contact that most often present with humans.

With this work we intended to investigate whether *C. burnetii* is a common bacteria in companion animals in an urban context. For that samples were collected from 173 dogs and 102 cats females to search for the presence of *C. burnetii* DNA and anti-*C. burnetii* phase I and II antibodies. Nested PCR was used for DNA screening in uterus (N= 176), blood (N= 167), vaginal swabs (N= 68), placentas (N= 24) and atypical samples (N= 4); all the animals in the studied population presented negative results. Antibodies against *C. burnetii* were investigated in plasma samples (N= 149) using the IFA technique with a cut-off value of 50, presenting positive results in three dogs (4.3%) and six cats (7.5 %) with titles ranging from <50 to 800 in phase I and <50 to 400 in phase II antigen.

In Portugal, the search for *C. burnetii* DNA in pets is a pioneer study. The prevalence found in the serogival study is comparable to that observed in the only existing work on this topic performed in dogs, reinforcing the results of the molecular screening. In summary, this study indicates that the exposure to *C. burnetii* is low in the studied population, suggesting that, in an urban context, the role of dogs and cats in human infection may be negligible.

**Keywords:** *Coxiella burnetii*, Cats, Dogs, PCR, IFA;

## Lista de abreviaturas

% - Percentagem

°C – Graus Celsius

16S rADN – *16S ribosomalADN*

ADN – Ácido desoxiribonucleico

APSW - *Abortion, premature delivery, stillbirth and weak offspring complex*

ARN – Ácido ribonucleico

bid – *Bis In Die*

*C. burnetii* – *Coxiella burnetii*

cbmip - *Coxiella burnetii macrophage infectivity potentiator*

CEVDI - Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas Dr Francisco Cambournac

DP – Desvio padrão

E.U.A. – Estados Unidos da América

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*Imunoaabsorção enzimática

EMBL – *European Molecular Biology Laboratory*

*et al.*, - e outros da locução latina et alii

FMV-ULHT – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

*g*– Aceleração gravitacional (unidade de força centrífuga relativa)

h – Horas

htp A – Proteína de choque térmico A

htp B – Proteína de choque térmico B

icd – Isocitrato desidrogenase

IFA – Imunofluorescência Indireta

IL-1 – Interleucina 1

IL-10 – Interleucina 10

IL-2 – Interleucina 2

INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge

kg – Quilograma

kpb – Quilo pares de bases

LAMP 1 - *Lysosomal-Associated Membrane Protein 1*

LCV – *Large Cell Variant*

LNIV – Laboratório Nacional de Investigação Veterinária

LPS – Lipopolissacárido(s)

máx. – Máximo

Mbp – Mega pares de bases

mg – Miligrama

min. – Minuto

mL – Mililitro

MLVA – *Multiple Locus Variable-number tandem repeat-Analysis*

mM – Milimolar

MST - *Multispacer sequence typing*

NaCl – Cloreto de Sódio

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal

p.v. – Peso vivo

pb – Pares de bases

PBS – Tampão Fosfato-Salino

PCR – Reação em cadeia de polimerase/reação de polimerase em cadeia

PCR *nested* – Reação de polimerase em cadeia duplicada

PFGE - *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*

pmol – Picomol

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

SCV – *Small Cell Variant*

SDC – *Small Dense Cell*

séc. – Século

seg. – Segundo(s)

sid - *Solo In Day*

sod B – Superóxido dismutase

spp. – espécies

t. a. – Temperatura ambiente

TBE – Tampão Tris-borato-EDTA

TE- Tampão Tris-EDTA

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

U – Unidades

URSS – União das Repúblicas Socialistas Soviéticas

UV – Ultravioleta

V – Volt

W – Watts

ng – Nanograma

$\mu$ L – Microlitro

$\mu$ M – Micromolar

## Índice

|                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Prefácio .....</b>                                                            | <b>18</b> |
| <b>I. Introdução.....</b>                                                        | <b>19</b> |
| <b>1. Enquadramento Histórico .....</b>                                          | <b>20</b> |
| <b>2. Situação.....</b>                                                          | <b>21</b> |
| 2.1. Na Europa .....                                                             | 21        |
| 2.2. Em Portugal .....                                                           | 22        |
| <b>3. Caracterização e ciclo de vida do agente .....</b>                         | <b>24</b> |
| <b>4. Classificação e grupos genómicos.....</b>                                  | <b>28</b> |
| <b>5. Epidemiologia.....</b>                                                     | <b>30</b> |
| <b>6. Patogénese .....</b>                                                       | <b>32</b> |
| <b>7. Manifestações Clínicas .....</b>                                           | <b>34</b> |
| <b>8. Diagnóstico Laboratorial .....</b>                                         | <b>36</b> |
| 8.1. Métodos Diretos .....                                                       | 36        |
| 8.2. Métodos Indiretos .....                                                     | 37        |
| <b>9. Tratamento e Prevenção .....</b>                                           | <b>39</b> |
| <b>10. Considerações sobre <i>C. burnetii</i> e os animais de companhia.....</b> | <b>41</b> |
| <b>II. Material e Métodos: .....</b>                                             | <b>46</b> |
| <b>1. Amostras biológicas de animais de companhia.....</b>                       | <b>46</b> |
| 1.1. Recolha do material .....                                                   | 46        |
| 1.2. Dissecção e preparação das amostras .....                                   | 48        |
| <b>2. Extração de ADN .....</b>                                                  | <b>49</b> |

|                                                                                   |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.1. Fundamento teórico .....                                                     | 49        |
| 2.2. Procedimento experimental .....                                              | 50        |
| <b>3. Reação de polimerase em cadeia (PCR) .....</b>                              | <b>52</b> |
| 3.1. Fundamento teórico .....                                                     | 52        |
| 3.2. Procedimento experimental .....                                              | 54        |
| <b>4. Visualização dos produtos de PCR .....</b>                                  | <b>56</b> |
| 4.1. Fundamento teórico .....                                                     | 56        |
| 4.2. Procedimento experimental .....                                              | 57        |
| <b>5. Sequenciação dos produtos de PCR.....</b>                                   | <b>57</b> |
| 5.1. Fundamento teórico .....                                                     | 57        |
| 5.2. Procedimento experimental .....                                              | 58        |
| <b>6. Imunofluorescência Indireta .....</b>                                       | <b>60</b> |
| 6.1. Fundamento teórico .....                                                     | 60        |
| 6.2. Procedimento experimental .....                                              | 60        |
| <b>7. Análise Estatística dos resultados .....</b>                                | <b>62</b> |
| <b>III. Resultados:.....</b>                                                      | <b>63</b> |
| 1.Caraterização das amostras recolhidas .....                                     | 63        |
| 2.Caraterização da amostra.....                                                   | 63        |
| 3. Pesquisa de ADN de <i>Coxiella burnetii</i> .....                              | 69        |
| 4. Pesquisa de anticorpos anti- <i>Coxiella burnetii</i> em fase I e fase II..... | 70        |
| <b>IV. Discussão de Resultados .....</b>                                          | <b>72</b> |
| <b>V. Conclusão.....</b>                                                          | <b>76</b> |
| <b>VI. Referências bibliográficas:.....</b>                                       | <b>77</b> |

|                    |          |
|--------------------|----------|
| <b>Anexos.....</b> | <b>I</b> |
|--------------------|----------|

## Índice de Tabelas

|                                                                                                                                                                                                         |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabela 1</b> - Número de casos declarados por Portugal à OIE entre 1996 e 2011.....                                                                                                                  | <b>23</b> |
| <b>Tabela 2</b> - Classificação de estirpes de <i>C. burnetii</i> de acordo com o grupo genómico e tipo de plasmídeo.....                                                                               | <b>30</b> |
| <b>Tabela 3</b> - Sequência de nucleótidos dos <i>primers</i> utilizados, cujo alvo é um fragmento com múltiplas cópias no genoma de <i>C. burnetii</i> , <i>transposonlike repetitive region</i> ..... | <b>55</b> |
| <b>Tabela 4</b> - Condições de amplificação utilizado para pesquisa de <i>C. burnetii</i> .....                                                                                                         | <b>56</b> |
| <b>Tabela 5</b> - Quantidade e ordem dos reagentes, bem como o programa de amplificação a usar na reação de sequenciação.....                                                                           | <b>59</b> |
| <b>Tabela 6</b> - Número total de amostras para pesquisa de <i>Coxiella burnetii</i> na população em estudo.....                                                                                        | <b>62</b> |
| <b>Tabela 7</b> - Tipo de alojamento e situação dos animais em estudo.....                                                                                                                              | <b>64</b> |
| <b>Tabela 8</b> - Registo de actividade fora do local de habitação.....                                                                                                                                 | <b>66</b> |
| <b>Tabela 9</b> - Número de partos e abortos registados nos animais em estudo.....                                                                                                                      | <b>66</b> |
| <b>Tabela 10</b> - Número de cães e gatos em contacto com outros animais.....                                                                                                                           | <b>67</b> |
| <b>Tabela 11</b> - Número total de amostras manipuladas para pesquisa de ADN de <i>C. burnetii</i> nas amostras em estudo.....                                                                          | <b>68</b> |
| <b>Tabela 12</b> - Número de suspeitos obtidos na pesquisa de ADN de <i>C. burnetii</i> nas amostras em estudo.....                                                                                     | <b>70</b> |
| <b>Tabela 13</b> - Caraterização dos animais com resultados positivos na serologia por IFA.....                                                                                                         | <b>71</b> |

## Índice de Figuras

|                                                                                                                                |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 1</b> - Modelo tipo do desenvolvimento do ciclo celular de <i>C. burnetii</i> numa célula eucariótica.....           | <b>26</b> |
| <b>Figura 2</b> - Representação esquemática tipo da estrutura da parede celular de <i>C. burnetii</i> em fase I e fase II..... | <b>27</b> |
| <b>Figura 3</b> - Resultado da eletroforese em gel de agarose da pesquisa de ADN de <i>C. burnetii</i> por PCR.....            | <b>69</b> |

## **Índice de Gráficos**

**Gráfico 1** - Idade dos animais incluídos no estudo.....**64**

**Gráfico 2** - Distribuição dos animais em estudo por localidade de origem.....**65**

## Prefácio

A presente dissertação resulta do trabalho desenvolvido durante estágio curricular para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária, na área de Saúde Pública.

O Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (CEVDI/ INSA), foi o local onde o estágio curricular teve lugar, em especial o trabalho laboratorial. Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto: “Febre Q – do diagnóstico à investigação epidemiológica de *Coxiella burnetii* no contexto da infeção humana”, financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) e que decorre no CEVDI/INSA em parceria com outras instituições, tendo como principal objetivo a caracterização eco-epidemiológica da infeção por *C. burnetii*. O vigente trabalho aborda o papel dos animais de companhia, em contexto urbano, no ciclo de transmissão de *C. burnetii*.

Na elaboração do trabalho laboratorial, manipularam-se amostras de cães e gatos para pesquisa molecular e serológica de *C. burnetii*. Desta forma, desenvolveram-se técnicas referentes à extração de ADN, amplificação da região génica *transposon* por PCR *nested*, análise de fragmentos obtidos por electroforese, purificação dos produtos obtidos, sequenciação para confirmação da sequência de ADN e pesquisa de anticorpos anti-*C.burnetii* em fase I e fase II. Para além das técnicas desenvolvidas, foi possível observar outros métodos de diagnóstico laboratorial, nomeadamente, PCR em tempo real e ELISA.

Durante o estágio curricular foi elaborado um folheto de divulgação do estudo (anexo 3). Foi, ainda, possível colaborar noutros trabalhos em curso, que serviram de base a uma comunicação oral na IV Reunião Ungulados Silvestres Ibéricos (RUSI), que decorreu nos dias 20 e 21 de Setembro de 2013, no Parque de Natureza de Noudar em Barrancos - com o tema “Rickettsiales em ungulados selvagens e seus ixodídeos” (anexo 4).

## I. Introdução

*Coxiella burnetii* é uma bactéria intracelular obrigatória que infeta uma ampla variedade de animais, nos quais se inclui o Homem. A doença resultante pode apresentar-se como um quadro agudo ou evoluir para a cronicidade sendo conhecida em Medicina humana por febre Q, termo que também é usado em veterinária, embora se defenda como mais correta a denominação de coxielose. Esta zoonose, que apresenta uma distribuição mundial, com exceção da Nova Zelândia e Antártida, é considerada emergente ou re-emergente em diversos países (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005).

O complexo ciclo de transmissão de *C. burnetii* faz com que a epidemiologia da doença nem sempre seja clara. Este é um agente, que durante a sua replicação, forma esporos muito resistentes e leves. Estes mantêm-se viáveis no meio ambiente, sendo facilmente disseminados por aerossóis ou correntes de ar, podendo originar infeções distantes do foco. Embora a via aerogénea seja a principal forma de transmissão de *C. burnetii*, há também a considerar vias alternativas de infeção, como a alimentar, a neonatal, a sexual ou a picada de artrópodes vetores. Neste contexto as carraças têm um papel importante na disseminação de *C. burnetii* pois, para além de vetores, são também consideradas reservatórios do agente na natureza (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005). A investigação epidemiológica está, ainda, dificultada pelo facto de inúmeros animais poderem estar envolvidos no ciclo de transmissão de *C. burnetii*.

Em termos da infeção humana, defende-se que sejam os animais domésticos a ter um papel de relevo (Welch *et al.*, 2003), em especial os ungulados, nomeadamente ovelhas, cabras e bovinos (Angelakis & Raoult, 2010). Contudo, há casos que não podem ser justificados pela exposição a estes animais, particularmente aqueles que ocorrem em contexto urbano. Pela proximidade dos cães e gatos ao Homem, quer em contexto rural quer em urbano, este é um grupo em que a exposição/infeção por *C. burnetii* pode ter particular interesse na epidemiologia da febre Q. Na literatura há já algumas referências a casos de infeção humana associados ao contacto com estes animais (Welch *et al.*, 2003). Ainda assim, poucos trabalhos têm sido realizados a este propósito, sendo escassas as referências encontradas na literatura nacional o que impulsionou a realização deste trabalho.

## 1. Enquadramento Histórico

Os primeiros registos da infeção por *C. burnetii* datam de 1935 e são atribuídos a Edward Holbrook Derrick, diretor do Laboratório de Microbiologia e Patologia do Departamento de Saúde de Queensland, ao descrever um surto febril agudo que afetava os trabalhadores do matadouro de Cannon Hill em Brisbane, Queensland, Austrália. Após constatar que todos os testes laboratoriais dos indivíduos afetados eram negativos para os agentes infecciosos conhecidos na altura, Derrick concluiu que o surto resultava de uma nova patologia de etiologia desconhecida e que por isso a denominou de “Q (Query) Fever” (Chmielewski & Tylewska-Wierbanowska, 2012).

*C. burnetii* só viria a ser isolada dois anos mais tarde, praticamente em simultâneo na Austrália e nos Estados Unidos da América (E.U.A.), embora em sequência de estudos independentes. Na Austrália, o agente foi isolado na continuação da investigação de Derrick, por Frank Macfarlane Burnett e Mavis Freeman, ao inocularem em cobaias amostras de sangue e urina dos doentes do surto de Brisbane (Philip, 1948 citado por Angelakis & Raoult 2010; Burnet & Freeman, 1937 citado por Honarmand, 2012). Com o isolamento confirmou-se a natureza bacteriana do agente da febre Q e a similaridade, morfológica e bioquímica, com os microrganismos do género *Rickettsia*, tendo passado a ser designado por *Rickettsia burnetii* (Philip, 1948 citado por Angelakis & Raoult, 2010). Nos Estados Unidos da América, o isolamento não intencional foi conseguido por Herald Cox e Gordon Davis, ao alimentarem em cobaias carraças *Dermacentor andersoni* provenientes da região Nine Mile, em Montana (Davis & Cox, 1938 citado por Welch *et al.*, 2003). Este investigadores do Rocky Mountain Laboratory desenvolviam um estudo sobre as espécies de carraças envolvidas na transmissão de *Rickettsia rickettsii*, o agente etiológico da febre exantemática das Montanhas Rochosas (Raoult, 1988). Inicialmente este isolamento constituiu apenas uma curiosidade científica uma vez que apesar de apresentar características semelhantes às rickettsias se desconhecia o seu potencial patogénico. Designações como “Nine Mile agent” ou *Rickettsia diaporica* são encontradas na literatura publicada na altura. O paralelismo entre este e o agente obtido na Austrália na sequência do surto de Brisbane só viria a ser feito em 1938, quando o agente Nine Mile ao ser inoculado em ovos embrionados originou uma infeção laboratorial accidental o que provou não só a sua patogenicidade para o homem como a semelhança clínica da doença à febre Q descrita por Derrick (Maurin & Raoult, 1999). Em 1948, Philip viria a uniformizar a nomenclatura do agente. Face à crescente evidência de particularidades

biológicas que o distinguiam das outras espécies de rickettsias, este foi reclassificado num novo género, denominado de *Coxiella* com uma única espécie - *Coxiella burnetii*, em homenagem aos investigadores responsáveis pelo seu isolamento. O isolado de “Nine Mile” constou como a estirpe de referência sendo, ainda hoje uma das mais usadas em investigação e diagnóstico (Santos *et al.*, 2007).

## **2. Situação**

Após as descrições de Derrick vários surtos e casos isolados da doença começaram a ser identificados num crescente número de países, tendo a patologia rapidamente adquirido um estatuto de zoonose de distribuição mundial. A Nova Zelândia e Antártida são as únicas áreas que permanecem indemnes. O avanço da tecnologia aplicada ao diagnóstico laboratorial, com o aumento da especificidade e sensibilidade das técnicas, possibilitou, também, uma melhor identificação de novos casos, contribuindo para aumentar o conhecimento da patologia e do quadro clínico associado.

### **2.1. Na Europa**

A primeira vez que *C. burnetii* foi detetada na Europa foi na Grécia, durante a 2ª Guerra mundial. A estirpe de *C. burnetii* envolvida foi, posteriormente, isolada por inoculação de cobaias com sangue de um paciente afetado no surto de Atenas em 1943. A patologia apresentava um quadro clínico idêntico ao provocado pelo vírus influenza e, como tal, os alemães chamaram-lhe “gripe dos Balcãs” (Serbezov *et al.*, 1999). Nos anos de 1944 e 1945, ocorreu ainda um surto que acometeu as tropas dos E.U.A., estacionadas em Itália e na Córsega. Após a 2ª Guerra Mundial, as áreas mais endémicas de febre Q na Europa eram, Portugal, Espanha, França, Itália, Suíça, sul da Alemanha, Eslováquia, Grã-Bretanha, Balcãs e o sul da URSS. Na Europa Central, a principal fonte de infeção para o homem eram bovinos e ovinos enquanto que, no sul da Europa, a principal fonte de infeção eram os caprinos (Marrie *et al.*, 1986; Marrie *et al.*, 1988a; Tissot-Dupont *et al.*, 1992; Chmielewski & Tylewska-Wierzabonoska, 2012).

A partir da década de oitenta, os surtos de febre Q começaram a surgir com maior relevância. Os focos locais deram lugar a grandes surtos com elevado número de infetados (Carrieiri *et al.*, 2002; Panaiotov *et al.*, 2009; King *et al.*, 2011). Este fenómeno

deveu-se à alteração de organização e estrutura de quintas produtoras de animais. Devido ao aumento da procura de produtos lácteos de cabra, o efetivo do mesmo sofreu um aumento e, desta forma, a criação intensiva e o transporte destes animais entre explorações potenciou a disseminação e a infeção entre animais (Serbezov *et al.*, 1999). A causa de infeção humana deveu-se, maioritariamente, à utilização das fezes do gado caprino como um fertilizante natural perto de áreas urbanas, bem como ao transporte dos animais utilizando vias de áreas densamente populadas (Enserink *et al.*, 2010).

A proximidade de um grande número de pessoas com animais infetados, sem estarem diretamente relacionados com a produção animal é outra das causas do aparecimento de grandes surtos. Exemplo disso foram os dois surtos verificados na Alemanha entre 2003 e 2005. No primeiro, que afetou 229 pessoas, a fonte da infeção foi um rebanho de ovelhas infetadas vendido num mercado local muito concorrido. O outro surto, acometeu 331 pessoas e teve origem num rebanho de ovinos que pastava nas proximidades de empreendimentos habitacionais (Porten *et al.*, 2006; Gilsdorf *et al.*, 2008). Contudo, o maior surto de sempre associado a *C. burnetii* foi o que ocorreu na Holanda, entre 2007 e 2010 associado aos caprinos. Neste período, mais de 4.000 casos de febre Q aguda foram notificados. A gravidade deste surto deveu-se ao grande aumento do efetivo caprino, que quadruplicou desde o ano de 1995, para mais de 350.000 animais, sendo explorações de tipo intensivo, com efetivos de grande dimensão (até 5.000 animais por exploração) estando as explorações muito próximo de áreas habitacionais. A tipagem genética por *Multiple Locus Variable-number tandem repeat-Analysis* (MLVA) demonstrou que, quer homens quer animais, foram infetados pela mesma estirpe de *C. burnetii* (Speelman, 2010; Tillburg *et al.*, 2012).

A notificação das infeções por *C. burnetii*, tanto em humanos como nos animais, é obrigatória em vários países europeus. Em qualquer dos casos, a subnotificação continua a ser um problema para a real avaliação do impacto desta zoonose.

## **2.2. Em Portugal**

Em Portugal, a doença no Homem foi descrita pela primeira vez, em 1948, por Fonseca e seus colaboradores com a descrição de vinte casos e com a obtenção de seis isolados de *C. burnetii*. Apesar de, ainda, não ter sido registado nenhum surto, a febre Q faz

parte, desde 1999, da lista de doenças de notificação obrigatória, ocorrendo, principalmente, no Centro e Sul do país (Santos *et al.*, 2007). Nestas regiões têm vindo a ser registados tanto casos agudos como situações crónicas, sendo as variantes de *C. burnetii* implicadas iguais às encontradas em pequenos ruminantes domésticos (Santos *et al.*, 2012).

Devido à ausência de estudos e à falta de diagnóstico de *C. burnetii* em Portugal, a prevalência desta bactéria só pode ser referida para algumas espécies pecuárias (Clemente *et al.*, 2009), uma vez que a doença em termos veterinários, em Portugal, não é de notificação obrigatória (EFSA, 2010). Como tal, os dados disponíveis sobre a prevalência são relativos, sobretudo, a bovinos notificados à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) pela Direcção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), entre 2006 e 2010, não estando disponibilizadas informações adicionais referentes aos mesmos (tabela 1).

**Tabela 1:** Número de casos declarados por Portugal à OIE entre 1996 e 2011

| Ano       | Bovinos | Ovinos | Caprinos |
|-----------|---------|--------|----------|
| 1996-1997 | -       | -      | -        |
| 1998      | 53      | 5      | -        |
| 1999      | 3       | 1      | -        |
| 2000      | 11      | -      | -        |
| 2001      | 24      | -      | -        |
| 2002      | 34      | -      | -        |
| 2003      | 10      | -      | -        |
| 2004      | 17      | -      | -        |
| 2005-2006 | -       | -      | -        |
| 2007      | 3       | -      | -        |
| 2008-2010 | -       | -      | -        |
| 2011      | -       | -      | 2        |

Fonte: Handistatus II, OIE, 2013; World Animal Health Information Data Base

Estudos pontuais comprovaram ainda o contacto de outros animais com *C. burnetii*. A presença anticorpos anti-*C. burnetii* foi demonstrada numa população de cães do canil municipal de Setúbal, tendo sido apurada uma prevalência de 4,8% (Bacellar *et*

*al.*, 1995). Infecções por *C. burnetii* foram demonstradas em ruminantes do jardim zoológico de Lisboa, com a detecção da bactéria em amostras de cérebro de fetos abortados de Palanca negra, *Hippotragus niger niger*, e Cob-untuoso, *Kobus ellipsiprymnus* (Clemente *et al.*, 2008). Casos de infecção ativa por *C. burnetii* foram também detetados em material abortivo de ovinos e caprinos (Clemente *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2012).

### 3. Caracterização e ciclo de vida do agente

*C. burnetii* é um bastonete pleomórfico, intracelular obrigatório, com uma dimensão que varia entre 0,3 a 1,0µm de comprimento e 0,2 a 0,4µm de diâmetro. Apresenta uma parede celular típica de uma bactéria Gram-negativa, no entanto, no que diz respeito à coloração de Gram, nem sempre cora como seria de esperar. A técnica de eleição para coloração deste microrganismo, à semelhança das rickettsias, é o Giménez (Giménez, 1964; Chmielewski & Tylewska-Wierzbanska, 2012; Honarmand, 2012).

Este microrganismo possui um cromossoma de formato circular com cerca de 5 Mbp e até cinco plasmídeos com 30-51 kbp que transportam cerca de 2% da sua informação genómica (Angelakis & Raoult, 2010; Chmielewski & Tylewska-Wierzbanska, 2012). O significado biológico dos plasmídeos embora, pouco claro, parece ser relevante devido à ocorrência de sequências comuns conservadas nas várias estirpes. Nas estirpes desprovidas de plasmídeos verifica-se, também, a presença de sequências homólogas integradas no cromossoma. No GenBank ou no EMBL, existem sequências parciais e completas de vários genes, das quais se destacam 23 sequências de cromossomas e 17 sequências de plasmídeos (Honarmand, 2012). Há sequências genómicas completas disponíveis de seis estirpes de *C. burnetii* nomeadamente, CBuG Q212, CBuK Q154, Dugway 5J108-111, RSA331, RSA493 e MSU Goat Q177. A estirpe Nine Mile RSA493 foi a primeira a ser sequenciada (Seshadri *et al.*, 2003).

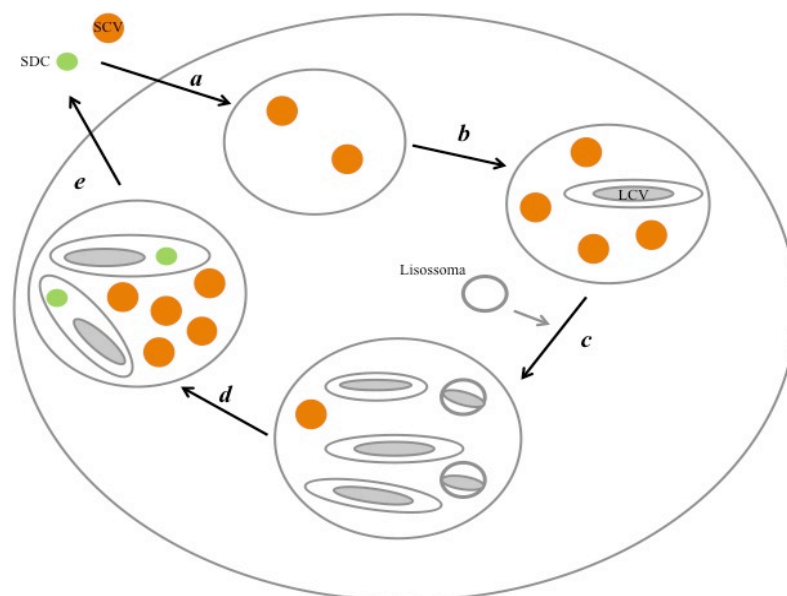
O ciclo replicativo de *C. burnetii* é complexo apresentando este microrganismo três formas morfológicas distintas: “*Large Cell Variant*” (LCV), “*Small Cell Variant*” (SCV) e “*Small Dense Cell*” (SDC) (Coleman *et al.*, 2004; Chmielewski & Tylewska-Wierzbanska, 2012). Estas formas podem ser diferenciadas pelo tamanho, morfologia e pelos peptidoglicanos constituintes da parede celular (Oyston & Davies, 2011). As LCV são as

formas metabolicamente ativas de *C. burnetii* que podem atingir até 1,0 µm, caracterizando-se pela sua forma irregular, citoplasma electrolucente com filamentos de cromatina dispersos (Angelakis & Raoult, 2010). As SCV e as SDC são consideradas as formas vegetativas de resistência de *C. burnetii* ao meio extracelular. As SCV não atingem mais que 0,4 µm e caracterizam-se por um citoplasma electrodenso com cromatina fortemente condensada. As SDC assemelham-se às SCV, sendo no entanto, mais estáveis (Coleman *et al.*, 2004; Angelakis & Raoult, 2010; Oyston & Davies, 2011; Chmielewski & Tylewska-Wierzbanska, 2012). Estas formas têm sido visualizadas no interior das LCV como endosporos que são libertados após a lise celular ou, então, durante a fissão binária transversal com divisão celular heterogénea (Williams *et al.*, 1981).

As SDC e SCV são consideradas as formas persistentes no hospedeiro e as formas resistentes no meio ambiente, particularmente, as SDC que são apontadas como mais estáveis (Coleman *et al.*, 2004; Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005; Chmielewski & Tylewska-Wierzbanska, 2012). Estas estruturas podem manter-se viáveis até 150 dias fora do hospedeiro, pois apresentam um alto nível de resistência à radiação ultravioleta, dissecação, calor, pressão, sonicação, stress osmótico e oxidativo. A estabilidade face a condições adversas pode ser a chave para a sobrevivência de *C. burnetii* no meio ambiente (Williams *et al.*, 1981; Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005; Chmielewski & Tylewska-Wierzbanska, 2012). Contudo, permanece por esclarecer se o agente sobreviverá isoladamente *per si* no ambiente. Na literatura há registo da deteção de ADN de *C. burnetii* em amostras ambientais mas, ainda, não foi possível provar que se tratava de material genético obtido de microrganismos viáveis, por exemplo, através do seu isolamento *in vitro* ou *in vivo*. Por outro lado, já foi provado que amibas de vida livre podem criar nichos intra-celulares nos quais há desenvolvimento de SDC; do mesmo modo esta pode ser uma forma de sobrevivência de *C. burnetii* no ambiente (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005).

O ciclo de vida de *C. burnetii* inicia-se com a entrada passiva das formas vegetativas na célula hospedeira e com o seu estabelecimento no interior de um vacúolo parasitóforo, estruturalmente idêntico a um lisossoma secundário (figura 1). O ambiente ácido do vacúolo parasitóforo, com valores de pH a variar entre 4,7 e 4,8 parece constituir o estímulo para a conversão das formas vegetativas em LCV. Esta ativação ocorre na fase inicial do ciclo ou fase lag, que corresponde aos primeiros dois dias de infeção, durante a qual não há aumento significativo do número de bactérias. Segue-se uma fase proliferativa ou fase exponencial em

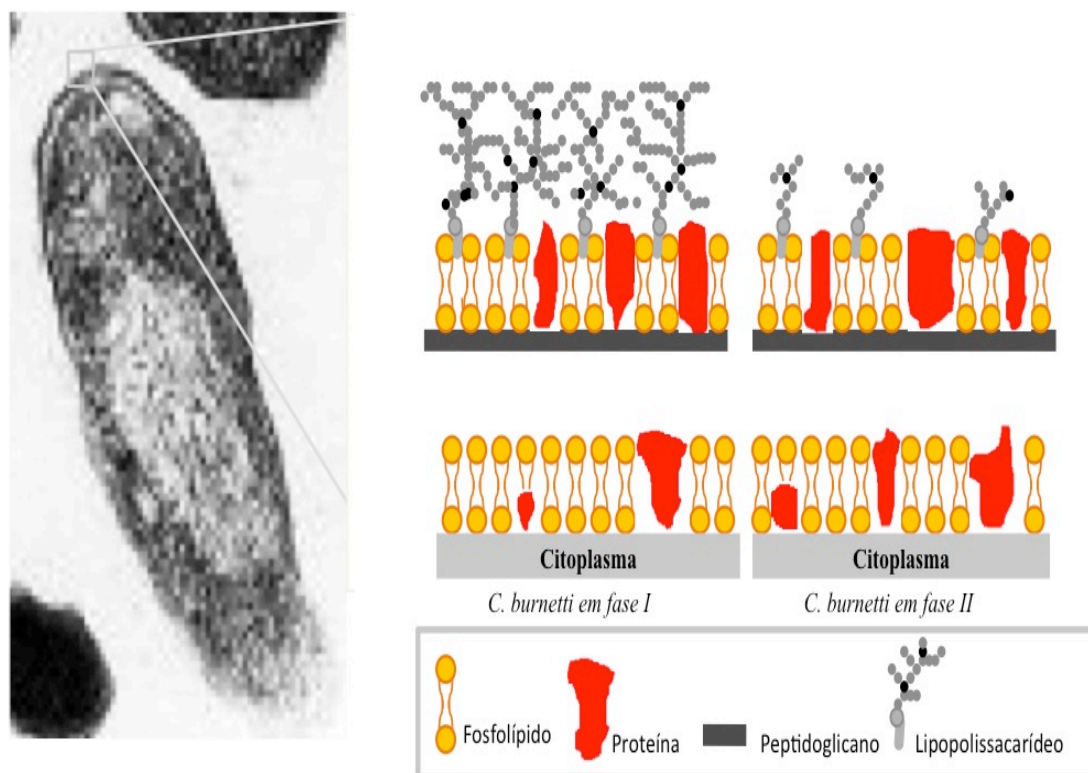
que as LCV se multiplicam por divisão binária, formando característicos aglomerados microbianos no interior do vacúolo parasitóforo (fase log). O crescimento intracelular de *C. burnetii* é relativamente lento, uma vez que o tempo de duplicação varia entre oito a doze horas (Oyston & Davies, 2011). Por volta do sexto dia de infecção, atinge-se a fase estacionária, surgem as SCV e as LCV parecem sofrer um processo de esporogenese apresentando SDC no seu protoplasma (Williams *et al.*, 1981). A infecção propaga-se com a lise celular e a libertação destas estruturas para o meio extracelular ou mesmo para fora do hospedeiro (Angelakis & Raoult, 2010; Chmielewski & Tylewska-Wierzbanska, 2012).



**Figura 1:** Modelo tipo do desenvolvimento do ciclo celular de *C. burnetii* numa célula eucariótica **a.** Entrada das formas SCV ou SDC no interior na célula e acidificação do endossoma (pH 5,5) do fagossoma; **b.** Fissão binária transversal das SCV e diferenciação em LCV; **c.** Fusão do endossoma com o lisossoma e diminuição do pH do fagolisossoma (pH 4,5); **d.** Fissão binária transversal das LCV e diferenciação em SCV, desenvolvimento nas LCV do endosporo polar (SDC); **e.** Libertação das formas SCV e SDC para o exterior da célula. (adaptado de Kováčová & Kazár, 2002; Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005)

Outra das características marcantes de *C. burnetii* é a variação antigénica do envelope celular comumente denominada variação de fase. Este fenómeno, que se traduz na variação entre a fase I e a fase II, é semelhante à variação lisa-rugosa das enterobactérias e caracteriza-se por alterações na estrutura e composição dos lipopolissacáridos (LPS) da

parede celular (Raoult *et al.*, 1998; Kowalczywska *et al.*, 2011). A fase I, denominada de virulenta ou natural, é encontrada a infectar organismos imunocompetentes, tais como artrópodes e animais, incluindo humanos, e é extremamente patogênica. Nesta fase o LPS é complexo, correspondendo ao tipo liso, com uma estrutura de carboidratos ramificada que impede a exposição das proteínas de superfície (figura 2).



**Figura 2:** Representação esquemática da estrutura da parede celular de *C. burnetii* em fase I e fase II (adaptado de Velasco, 1996).

Segundo Amano *et al.*, (1984) antígeno-O polissacarídeo do LPS de fase I é composto pelo dissacarídeo galactosaminuronilo-alfa-(1,6)-glucosamina e por dois açúcares únicos, nomeadamente 6-desoxi-C-metilglucose e dihidroxistreptose 3-C-(hidroximetil)-lixose, responsáveis pela especificidade antigênica. A principal diferença entre o LPS de fase I para o LPS de fase II é uma heptose ramificada na terceira posição e, provavelmente, a D-manose terminal da quarta posição. A fase II é produzida apenas artificialmente, em resultado da manipulação laboratorial, por passagens sucessivas de *C. burnetii* em linhas celulares ou ovos embrionados, nunca tendo sido observada em infecções naturais (Honarmand, 2012). Na

fase II o LPS é do tipo rugoso, apresentando uma estrutura mínima, fracamente truncada, que deixa em exposição as proteínas da parede celular e onde estão ausentes o antígeno - O (cadeia específica de polissacarídeos) e alguns oligossacarídeos (Beare *et al.*, 2009) (Figura 2). A alteração parece estar associada a uma virulência atenuada dado que as bactérias em fase II, quando inoculadas em hospedeiros imunocompetentes, são rapidamente destruídas.

A variação antígenica de *C. burnetii* tem sido usada em proveito do diagnóstico serológico de febre Q (Raoult, 1988). Fazendo recurso dos dois tipos de antígeno (*C. burnetii* em fase I e fase II), é possível diferenciar um quadro agudo de um crônico. O quadro agudo é, habitualmente, caracterizado por elevados títulos de anticorpos anti-proteínas de superfície, que se ligam ao antígeno em fase II (visto que é nesta fase que os microrganismos têm as proteínas de superfície expostas). Em contrapartida, as situações crônicas apresentam altos títulos de anticorpos quer anti-proteínas de superfície quer anti-LPS; estes últimos são reconhecidos ao ligarem-se ao antígeno em fase I onde se encontram microrganismos com o LPS completo, ou seja, com as estruturas antigénicas intactas.

#### 4. Classificação e grupos genómicos

O género *Coxiella* foi, originalmente, integrado na ordem Rickettsiales, família Rickettsiaceae juntamente com o género *Rickettsia* (Philip, 1948 citado por Santos *et al.*, 2007). Contudo, a aplicação de técnicas moleculares à filogenia veio questionar essa taxonomia demonstrando o afastamento genético de *C. burnetii* em relação aos membros da ordem Rickettsiales e demais  $\alpha$ -proteobactérias e a sua semelhança com algumas  $\gamma$ -proteobactérias como *Legionella* spp. e *Francisella tularensis*. Em 2001, o agente foi definitivamente reclassificado na Ordem Legionellales, Família Coxiellaceae (Garrity *et al.*, 2001).

Ao longo dos tempos, vários isolados de *C. burnetii* têm vindo a ser obtidos e, embora se distingam características fenotípicas e genotípicas que têm justificado a definição de variantes ou estirpes, as diferenças não são, até ao momento, suficientes para a diferenciação de espécies. Entre as estirpes mais conhecidas encontram-se Nine Mile RSA493, CBuG Q212, CBuK Q154, Dugway 5J108-111, RSA331, e MSU Goat Q177. Para além das diferenças na sequência cromossómica, há ainda a registar nas estirpes de *C. burnetii* diferenças nas sequências dos plasmídeos (Kowalczywska *et al.*, 2011).

O complexo ciclo de transmissão deste agente pela sua capacidade de resistência no ambiente, possibilidade de transmissão aerogénea e vasto leque de hospedeiros associados, tem levado à necessidade de caracterizar os isolados na tentativa de uma melhor compreensão da epidemiologia da doença. Vários métodos de genotipagem têm vindo a ser utilizados ao longo dos tempos, tais como: i) endonucleases de restrição de ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico ou *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), que levaram à definição de seis grupos genómicos - genogrupos I a VI; ii) análise de plasmídeos e a sua distinção em quatro sequências tipo - QpH1, QpRS, QpDG ou QpDv; iii) eletroforese em campo pulsado ou *pulse-field gel electrophoresis* (PFGE) com o alargamento para 20 grupos genómicos; iv) sequenciação dos genes isocitrato desidrogenase (*icd*), *comI* e *mucZ* e mais recentemente, de regiões intragénicas ou *multispacer sequence typing* (MST) que permite distinguir 34 genótipos (ST1 até ST34). A aplicação destas técnicas tem permitido somar evidências da associação de determinadas estirpes, grupos genómicos ou tipos de plasmídeos com a evolução da doença (Chmielewski & Tylewska-Wierzbanska, 2012; Santos *et al.*, 2012). Tem também servido para demonstrar a globalização do agente, uma vez que têm sido encontradas estirpes de todos os grupos, na Europa, Ásia, América do Norte e África (Chmielewski & Tylewska-Wierzbanska, 2012).

Na tabela 2, é apresentada a classificação de várias estirpes de *C. burnetii* em função do seu grupo genómico e tipo de plasmídeo. O plasmídeo QpH1, com 36 kpb, ocorre nas estirpes dos três primeiros grupos genómicos (I, II e III) e está associado, maioritariamente, à infeção aguda. O plasmídeo QpRS foi identificado nas estirpes do grupo IV, isoladas a partir de material abortivo de cabras e de humanos com endocardite. O plasmídeo QpDV, com 30 kpb, tem sido isolado de pacientes com quadro agudo e quadro crónico de febre Q. O grupo V contém as estirpes sem plasmídeos mas que contêm sequências homólogas do plasmídeo QpRS integradas no ADN cromossómico. O plasmídeo QpDG, com 42 kpb, caracteriza o grupo VI com isolados de roedores, ruminantes e humanos com quadros agudos e crónicos (Chmielewski & Tylewska-Wierzbanska, 2012). Os 34 tipos de genótipos obtidos por MST podem, também, ser agrupados em três grupos homogéneos, tendo por base os grupos definidos pela análise do ADN dos plasmídeos. Como tal, o primeiro grupo contém as estirpes com o plasmídeo QpRS e inclui os tipos ST1 até ST10, ST26, ST28, ST30 e ST31. O segundo grupo, inclui as estirpes QpH1, e tem os tipos do ST11 até ST20, ST25, ST22, ST27, ST29, ST32 e ST33. O último e terceiro grupo inclui as estirpes sem plasmídeo e do

plasmídeo QpH1, sendo o tipo ST21 o único (Chmielewski & Tylewska-Wierzbanowska, 2012).

**Tabela 2-** Classificação de estirpes de *C. burnetii* de acordo com o grupo genómico e tipo de plasmídeo.

| Grupo genómico (por RFLP) | Tipo de Plasmídeos | Estirpes                                                                                   |
|---------------------------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| I                         | QpH1               | Nine Mile RSA 493, Austrália QD RSA435, Califórnia 33 RSA329, Ohio 314 RSA270, Dyer RSA345 |
| II                        | QpH1               | Henzerling RSA331 e M44 RSA459                                                             |
| III                       | QpH1               | Idaho Goat Q195, Koka                                                                      |
| IV                        | QpRS               | MSU Goat Q177, Priscilla Q177, Canada Goat Q218, K Q154, P Q173 e F Q228                   |
| V                         | -                  | Scurry Q217, Q229, G212, L Q216                                                            |
| VI                        | QpDG               | Dugway 7E22-57, Z257 e Z3027                                                               |

## 5. Epidemiologia

*C. burnetii* encontra-se amplamente distribuída na natureza, possuindo como principais reservatórios os artrópodes, concretamente as carraças que contam com mais de quarenta espécies implicadas pertencentes a 12 géneros, bem como várias espécies de aves e mamíferos terrestres. Neste último grupo, estão particularmente associados ao agente os ruminantes domésticos – bovinos, ovinos, caprinos (Lang 1990; Maurin & Raoult, 1999). Estão, ainda, descritas infeções por *C. burnetii* noutros mamíferos domésticos, como cães, gatos suínos, equinos (George & Marrie, 1987; Leon *et al.*, 2012; Runge *et al.*, 2012) e, também, na fauna selvagem (Sidwell *et al.*, 1964; Ejercito *et al.*, 1993) como coelhos, cervídeos (Ruiz-Fons *et al.*, 2008), raposas, javalis (Špitalská & Kocianová, 2003; Toledo *et al.*, 2009; Cooper *et al.*, 2013), cangurus (Potter *et al.*, 2011), ursos (Madic *et al.*, 1993; Dunbar *et al.*, 1998), entre outros (Connolly, 1968; Bayer, 1982; OIE 2010; McQuiston & Childs, 2002; Koch *et al.*, 2010; Agerholm, 2013; Roest *et al.*, 2013). Alguns estudos comprovam, ainda, a presença deste agente em peixes e mamíferos marinhos (Lapointe *et al.*, 1999; Marrie, 2003; Kersh *et al.*, 2010). A epidemiologia de *C. burnetii* pode, contudo, variar de país para país. Por exemplo, os Pombos de Cauda são apontados como os principais responsáveis pelo transporte do agente da Europa Ocidental

para a Irlanda. Na Grã-Bretanha, os ratos selvagens são considerados o seu principal reservatório (Raoult, 1988).

O ciclo de transmissão do agente é perpetuado com a infecção de novos hospedeiros suscetíveis quer durante a parasitação, predação, ou outro contacto, quer pela simples co-habitação com animais infetados. Os animais infetados contaminam outros animais e o meio envolvente através da eliminação do agente nas excreções e secreções como fezes, urina, sémen, leite e, em especial, nos produtos do parto ou material abortivo, visto que a infecção se reativa durante a gestação. As placentas dos animais infetados podem conter concentrações muito altas de *C. burnetii*, chegando a atingir valores na ordem de  $10^9$  bactérias por grama de tecido. Nas carraças, o agente é transmitido transtadialmente pelas várias fases evolutivas, transovaricamente à sua descendência e através de saliva e/ou fezes aos animais que parasitam. Como o agente se multiplica nas células do intestino médio são as fezes que têm o papel de relevo na disseminação do agente. As fezes das carraças contêm numerosos endosporos de *C. burnetii* viáveis, onde podem persistir durante longos períodos de tempo (Kováčová & Kazár, 2002).

No contexto da doença humana, são os bovinos, ovinos e caprinos a principal fonte de infecção para o Homem, sendo a inalação de aerossóis ou poeiras contaminadas com esporos de *C. burnetii* a principal forma de transmissão do agente. Existem estudos que apontam, também, para o envolvimento de outras espécies pecuárias como suínos e equinos ou mesmo de espécies cinegéticas, como o coelho bravo, sugerindo-se que a infecção tenha resultado da manipulação das carcaças (Marrie, 2003). Além das referenciadas, alguns autores defendem, ainda, o papel que os pequenos animais, que estão a atingir proporções bastante significativas em meio urbano, como cães, gatos e, mais recentemente, coelhos, possam vir a ter na epidemiologia da febre Q no século XXI (Fournier *et al.*, 1998; Angelakis & Raoult, 2010; Honarmand, 2012). Na Nova Escócia a exposição a gatas parturientes está associada a casos de febre Q sendo, por isso, considerado cada vez mais um importante foco de infecção em especial em meio urbano. No Canadá os estudos comprovam que cerca de 20% dos gatos apresentam anticorpos anti-*C. burnetii* (Raoult, 1988). Quanto às carraças, embora sejam consideradas os principais vetores e reservatórios naturais de *C. burnetii*, nomeadamente as pertencentes aos géneros *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Amblyoma* e *Dermacentor*, cada vez mais se desvaloriza o seu papel na transmissão do agente ao Homem. Apesar de haver casos associados às carraças, a via de infecção mais frequente para o homem continua a ser a via

aerogénea (Kováčová & Kazár, 2002). Há, também, a considerar a possibilidade de vias alternativas de infecção, como a alimentar por ingestão de leite e derivados não pasteurizados, a transfusional e inoculação intradérmica, a vertical e a sexual. A transmissão sexual foi demonstrada em ratos domésticos e o isolamento de *C. burnetii* em sêmen de touro coloca a possibilidade da transmissão por via sexual quer nos animais de interesse pecuário quer no homem. Alguns autores indicam que os homens podem desenvolver orquites como consequência de infecção por *C. burnetii* (Raoult & Marrie, 1995; Marrie, 2003; Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005; Honarmand, 2012). Existem, também, evidências que suportam a transmissão sexual entre humanos (Milazzo *et al.*, 2001).

De um modo geral, as infecções por *C. burnetii* afetam essencialmente indivíduos que mantêm contacto com animais infetados, sendo mais frequente em trabalhadores rurais, pastores, médicos veterinários e trabalhadores de matadouros (Hart & Path, 1973). Contudo, somam-se relatos de contacto indireto com animais infetados, como na Suíça em que cerca de 415 pessoas desenvolveram febre Q, por habitarem perto de um trilho utilizado por gado ovino (Hart & Path, 1973; Raoult, 1988). Outro caso ocorreu em Inglaterra em que o transporte de palha contaminada e fezes causou um surto de febre Q na população que vivia junto à estrada pela qual eram transportados os dejetos animais contaminados. No entanto, ainda há casos de infecção mais indireta como, por exemplo, o surto de trabalhadores de lavandarias que ficaram infetados depois de manusearem roupas contaminadas com *C. burnetii* (Sawyer *et al.*, 1987; Raoult, 1988).

## 6. Patogénese

As células alvo de *C. burnetii* são os macrófagos e os monócitos. No local de entrada – tipicamente os pulmões – as formas extracelulares de *C. burnetii* invadem as células residentes, onde proliferam e com as quais são transportadas a nível sistémico, produzindo alterações histológicas, não só nos pulmões mas, também, no fígado e baço. Na sequência destes eventos surgem, então, os sinais clínicos da doença.

A patogenia da infecção por *C. burnetii* é determinada tanto pelas características do agente etiológico como pela reação do hospedeiro. São apontados como fatores patogénicos de *C. burnetii* o LPS, enzimas como a fosfatase ácida, superóxido dismutase, catalase e as proteínas de superfície. Além destes, a proteína potenciadora de infectividade de macrófagos

(mip - *macrophage infectivity potentiator*) tem sido sugerida, também, como eventual fator patogénico. Infecções agudas têm sido associadas a respostas inflamatória e imunitária protetora, enquanto que as infecções crónicas estão relacionadas com uma resposta ineficiente, manifestando-se através da incapacidade de induzir INF- $\gamma$  e níveis altos de anticorpos (Kováčová & Kazár, 2002).

Os macrófagos possuem uma importante função no desenvolvimento de imunidade. As interleucinas, nomeadamente IL-1 e IL-12 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), secretadas pelos macrófagos infetados, são capazes de modular a resposta celular. Tem sido atribuído ao TNF- $\alpha$  um papel na sobrevivência de *C. burnetii* no interior dos macrófagos, no entanto, ainda não está estabelecido como é que este afeta a resposta por parte dos monócitos. O TNF- $\alpha$  ativa a cascata de inflamação secundária, provocando lesões endoteliais, alterações hemodinâmicas e metabólicas sendo, por isso, considerado uma citocina de extrema importância na inflamação e um mediador endógeno no choque séptico. Kubes *et al.*, (2006) demonstraram que o LPS, procedente de várias estirpes de *C. burnetii*, estimula os macrófagos a produzirem diferentes valores de TNF- $\alpha$ , sendo os valores mais altos associados à forma crónica da patologia. A forma crónica da febre Q está, ainda, associada ao excesso de produção de IL-10 e, como tal, deficiente fagocitose por parte dos monócitos. Alguns autores defendem que a multiplicação de *C. burnetii* no interior dos monócitos necessita de uma citocina de macrófagos inativados, como a IL-10, sendo esta, muitas vezes, utilizada como marcador para monitorizar a eficiência do tratamento (Kováčová & Kazár, 2002).

Na patogenia são determinantes as estratégias de sobrevivência e persistência de *C. burnetii* na célula hospedeira. A entrada da bactéria nos monócitos ou macrófagos ocorre por fagocitose mediada pela integrina  $\alpha\beta3$ . O *Toll-like receptor 4* (TLR4) tem, também, um importante papel na captação da forma virulenta de *C. burnetii*, uma vez que está envolvido no reconhecimento do LPS e na estrutura da parede celular (Angelakis & Raoult, 2010). *C. burnetii* estimula o surgimento de pseudópodes e reorganização de filamentos de actina transiente (Angelakis & Raoult, 2010). A adaptação à vida intracelular está diretamente relacionada com o pH ácido do fagossoma. O baixo valor de pH permite a entrada de nutrientes necessários ao metabolismo da bactéria, sendo também um importante limitante à ação de antibióticos. Como tal, a sobrevivência da bactéria no interior dos macrófagos baseia-se no controlo da fagocitose e na prevenção da maturação dos fagossomas e fusão fagolisossomal final. Assim, a forma virulenta de *C.*

*burnetii* apresenta-se nos fagossomas que expressam marcadores endossomais como o receptor manose-6-fosfato, Lysosomal-Associated Membrane Protein 1 (LAMP1) e protões ATPase, mas que não adquirem marcadores de maturação como a catepsina D. Ao contrário, a forma avirulenta da bactéria é encontrada em fagossomas com catepsina D (Angelakis & Raoult, 2010).

## 7. Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas da infeção por *C. burnetii* variam consoante a espécie de hospedeiro e entre indivíduos.

No homem, a infeção pode ser assintomática (em 50% dos casos) ou sintomática, recebendo a designação de febre Q. Nos casos sintomáticos, reconhece-se a forma aguda e a forma crónica da doença. A febre Q aguda manifesta-se como quadros febris autolimitados com ou sem focalizações. Estas, se presentes ocorrem principalmente ao nível pleuropulmonar e hepático e mais raramente, neurológico ou cardiovascular (Sawyer *et al.*, 1987; Raoult & Marrie, 1995; Fournier *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2007). Assim, é frequente o aparecimento de casos agudos com febre isolada, hepatite e/ou pneumonia atípica. Estima-se que em 2% dos casos a infeção por *C. burnetii* evolua para a cronicidade. Na febre Q crónica a endocardite é a principal apresentação clínica mas podem, também, ser afetados os ossos, as artérias e o fígado, originando casos de aneurisma, cirrose e fibrose hepática, osteoarterite e osteomielite (Raoult & Marrie, 1995; Fournier *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2007). Não está, ainda, esclarecido o que determina a persistência de *C. burnetii* e a evolução da infeção para a cronicidade mas esta é uma condição que está particularmente associada a estados de imunodepressão e predisposição valvular, vascular ou óssea (por exemplo, a existência de próteses). A gravidez é, também, uma condição predisponente de febre Q crónica. Na mulher grávida, a bactéria aloja-se na glândula mamária e no útero provocando placentites/endometrites, aborto, morte fetal intrauterina, fetos prematuros com baixo peso ao nascimento podendo, ainda, condicionar gravidezes futuras (Fournier *et al.*, 1998; Maurin & Raoult 1999; Angelakis & Raoult 2010).

Em termos veterinários, a infeção por *C. burnetii* está sobretudo estudada nos ruminantes domésticos. Ao contrário dos humanos, os animais, de um modo geral não desenvolvem doença, que neste caso é mais corretamente designada por coxielose em vez

de febre Q (Kováčová & Kazár, 2002; Angelakis & Raoult 2010). Ainda assim, podem ocorrer quadros de febre, broncopneumonia, mastites, fim da lactação mas, sobretudo, manifestações clínicas associadas a transtornos reprodutivos, como, endometrites, abortos, nados mortos, crias com baixa condição corporal, entre outros que refletem a localização preferencial do agente. Nos animais infetados, os achados mais frequentes são placentas com espessamento fibroso intracotiledonar e exsudados lípidos, resposta inflamatória severa no miométrio das cabras e metrite nos bovinos (Arricau-Bouvery & Rodolakis 2005; Angelakis & Raoult 2010; Roest *et al.*, 2012). Quando ocorrem abortos, estes são mais frequentes no final da gestação, com fetos aparentemente normais apresentando somente as placentas alteradas, conforme mencionado acima (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005).

Segundo Agerholm (2013) os transtornos reprodutivos nos animais domésticos podem ser agrupados em: i) complexo aborto, parto prematuro, morte fetal e descendência fraca (APSW - *Abortion, premature delivery, stillbirth and weak offspring complex*); ii) infertilidade, subfertilidade e esterilidade e iii) endometrite e metrite e retenção placentária (Agerholm, 2013). O complexo APSW resulta de uma infecção com *C. burnetii* e depende da virulência da estirpe em questão, da resposta imunitária quer da mãe quer do feto, da gravidade das lesões provocadas pela infecção, disseminação fetal, número de fetos infetados, idade e tempo de gestação. Contudo, e extrapolando o complexo APSW para situações práticas, significa que só se deve suspeitar de coxielose se a totalidade do complexo ocorrer num efetivo e não se ocorrer somente uma das condições. A infertilidade, subfertilidade e esterilidade são utilizadas para denominar a diminuição da capacidade reprodutiva. A subfertilidade e a esterilidade só são consideradas fatores se ocorrer como condição independente ou enquanto complicação de um quadro de coxielose. Endometrite e metrite indicam uma inflamação do útero. Na prática clínica a inflamação do útero no pós-parto é dividido em metrite puerperal, endometrite clínica, endometrite subclínica e piómetra. No entanto, estes parâmetros só são válidos mediante análise histopatológica. A retenção placentária é frequente nos ruminantes e só é considerada quando não há expulsão da placenta nas 24 horas pós-parto (Agerholm, 2013).

Nas cabras, segundo Sánchez *et al.*, (2006), durante a gestação ocorre uma inflamação exacerbada do miométrio e do estroma adjacente, aparecendo os trofoblastos

alterados e espumosos. Nos bovinos, por norma, a única manifestação clínica é a metrite que pode persistir por longos meses sem, no entanto, condicionar gestações seguintes.

## 8. Diagnóstico Laboratorial

Em média no humano, o diagnóstico de *C. burnetii* é, muitas vezes, dificultado pelos quadros assintomáticos ou inespecíficos, provocando, consequentemente, muitos casos sub-diagnosticados (Kowalczevska *et al.*, 2011). Em medicina veterinária, além dos quadros inespecíficos acresce o facto dos pedidos de testes laboratoriais específicos para despite da infeção serem pouco usuais na rotina clínica (Angelakis & Raoult, 2010). No entanto, depois do surto de 2009 na Holanda, e dado o carácter zoonótico de *C. burnetii* e a declaração obrigatória da doença humana, o diagnóstico em medicina veterinária tem vindo a ganhar alguma relevância, em especial no caso de abortos em ruminantes. Posto isto, para que o diagnóstico de *C. burnetii* seja possível é necessário recorrer a testes laboratoriais específicos. Estes dividem-se em dois grupos: i) métodos diretos, que permitem a deteção do agente e ii) métodos indiretos que permitem a pesquisa de anticorpos específicos produzidos em consequência da exposição ao agente (Raoult, 1988; Kováčová & Kazár, 2002).

### 8.1. Métodos Diretos

Existem três tipos de testes que permitem detetar a bactéria em amostras biológicas:

- Visualização do agente nos tecidos por marcação imunocitoquímica, hibridação *in-situ* ou imunofluorescência direta. Particularmente, a imunocitoquímica tem sido muito usada para a pesquisa da presença de *C. burnetii* em cortes histológicos de válvulas cardíacas e tecido vascular de doentes com suspeita de febre Q crónica (Brouqui *et al.*, 1994; Maurin & Raoult, 1999).
- Amplificação de ADN do agente por reação em cadeia de polimerase (PCR simples), duplicada (PCR *nested*) ou em tempo real. Com este propósito, têm sido utilizados vários pares de oligonucleótidos iniciadores (*primers*) que têm como alvo segmentos genómicos de cópia simples ou múltipla no genoma de *C. burnetii*. Têm sido utilizados como alvo molecular genes que codificam proteínas de superfície e/ou enzimas como isocitrato

desidrogenase (*icd*), superóxido dismutase B (*sodB*), proteína de superfície de 27 kDa, *Coxiella burnetii* macrophage infectivity potentiator (*cbmip*) e proteínas de choque térmico *htpA* e *htpB*, para além do gene *16S ribosomalADN* (16S rADN) e do elemento de inserção *IS1111* (Santos *et al.*, 2007; OIE, 2010). A análise molecular permite, virtualmente, o estudo de qualquer amostra biológica. No diagnóstico de infeções agudas em humanos, são muito usadas amostras de sangue total colhido em EDTA (Fournier *et al.*, 1998; Maurin & Raoult, 1999). Podem, ainda, ser usadas outras amostras que devem adequar-se à focalização da febre Q, por exemplo amostras valvulares, vasculares, ósseas, placentárias, entre outras. Em medicina veterinária, as amostras mais utilizadas para o rastreio molecular incluem exsudados vaginais, amostras de leite individual ou do efetivo leiteiro (*bulk tank*), amostras de placenta e de fetos (Lorenz *et al.*, 1998; Angelakis & Raoult, 2010).

- Isolamento de *C. burnetii* através da cultura da bactéria em vários tipos de células de crescimento contínuo *in vitro*, nomeadamente as linhas de tipo macrofágico (P388D1 e J774), fibroblástico (L929) e endotelial (Vero). Esta técnica baseia-se na centrifugação da amostra sobre uma monocamada de células. As amostras mais frequentemente utilizadas são o sangue total, fragmentos de válvulas cardíacas, aneurismas, placenta e material abortivo (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005; Angelakis & Raoult, 2010). Esta técnica exige, contudo, que as bactérias existentes na amostra estejam viáveis, pelo que as colheitas para isolamento devem, se possível, ser feitas antes da administração de antibióticos e em condições de esterilidade, para evitar a contaminação das culturas com microrganismos indesejáveis. Apesar de muito específica, esta técnica não é muito sensível, acrescentando-se, ainda, o facto da confirmação do isolamento poder ser demorada (duas semanas a dois meses) sendo, por isso, geralmente, feita em paralelo com a deteção molecular.

## 8.2. Métodos Indiretos

Na pesquisa de anticorpos anti-*C. burnetii*, no plasma e no soro, destacam-se, sobretudo, dois métodos:

- Imunofluorescência indireta (IFA), também conhecida como técnica de dupla camada. Esta é uma das técnicas mais exatas e sensíveis, sendo considerada de referência pela Organização Mundial de Saúde no diagnóstico serológico da febre Q, em medicina

humana (OMS, 1982; Muso & Raoult, 1995; Fournier *et al.*, 1998). A IFA pode ser utilizada para a detecção de anticorpos anti- *C. burnetii* em fase I e fase II das classes G, M e A (Fournier *et al.*, 1998). O *cut-off* ou limiar de positividade, utilizado varia de laboratório para laboratório, dependendo da cinética dos anticorpos e da reatividade da população em estudo. A resposta humoral, da qual depende o resultado do serodiagnóstico, varia consoante se trate de uma infecção aguda ou crónica, não se devendo considerar negativo para febre Q um caso quando apenas uma amostra foi analisada, mesmo que o resultado de IFA tenha sido negativo. O serodiagnóstico deve ser sempre realizado em duas amostras colhidas com um intervalo de duas a quatro semanas (Dupuis *et al.*, 1985; Muso & Raoult, 1995; Fournier *et al.*, 1998).

- Imunoabsorção enzimática (ELISA), com sensibilidade e especificidade comparáveis à IFA. Esta técnica é extremamente útil em medicina veterinária na triagem de amostras de grande dimensão pois é passível de automatização. É adequada para a pesquisa de anticorpos anti-*C. burnetii* em fase I e II num amplo número de espécies animais existindo no mercado diversos kits comerciais (Kováčová *et al.*, 1998; OIE, 2010). A interpretação dos resultados serológicos é, no entanto, mais complexa na perspectiva veterinária do que na humana. De acordo com Arricau-Bouvery & Rodolakis (2005) a infecção por *C. burnetii* é difícil de diagnosticar por técnicas serológicas, uma vez que os anticorpos detetados podem persistir após a fase aguda da patologia. Estes testes não permitem a identificação individual de animais que excretam a bactéria nas fezes e no leite, não havendo, por isso, relação entre a resposta serológica e a excreção do agente. A maioria dos animais que excreta a bactéria no muco vaginal, fezes e leite são seropositivos; contudo, outros podem ser seropositivos e não excretar o agente ou, ainda, permanecerem seronegativos e excretar o agente. Estes últimos são de extrema importância para a saúde pública e animal. Nestes casos, o único e mais rápido meio de diagnóstico que permite identificar os animais que excretam a bactéria é a PCR. Só a PCR permite a detecção de metrites causadas por *C. burnetii*, sendo a associação de PCR e ELISA a melhor forma de diagnóstico de coxielose em ruminantes (Berri *et al.*, 2000; Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005; Alsaleh *et al.*, 2011).

## 9. Tratamento e Prevenção

A doxiciclina (100mg bid, durante 15-21 dias) é o tratamento de eleição para casos de febre Q aguda, sendo o tratamento mais eficaz quando iniciado nos primeiros três dias da patologia, uma vez que o efeito bacteriostático é suficiente para a melhoria do estado clínico. Contudo, os casos crônicos necessitam de tratamento prolongado (12 a 38 meses), uma vez que o efeito bacteriostático pode controlar o quadro clínico mas não é o suficiente para chegar à cura. Nestes casos é necessário ter em atenção que o pH é crucial para a obtenção do efeito desejado do antibiótico contra a *C. burnetii* e, como tal, é necessário potenciar o seu efeito bactericida com a adição de um agente alcalinizante, de preferência, que consiga atuar no meio intravacuolar, ou um antibiótico estável a nível ácido (Raoult, 1988; Raoult & Marrie, 1995; Maurin & Raoult, 1999).

Nos ruminantes, o tratamento da coxielose consiste na administração de tetraciclina, nomeadamente de oxitetraciclina (duas injeções, na dose de 20 mg por kg de peso vivo) no último mês de gestação, embora este tratamento não suprima os abortos nem a excreção da bactéria no parto, apenas minimiza o problema (Behymer *et al.*, 1977; Woernle *et al.*, 1985; Berri *et al.*, 2002; Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005; Berri *et al.*, 2007). Nos efetivos infetados, em especial nas fêmeas *indoor*, o material reprodutivo expelido durante o parto ou aborto deve ser queimado ou enterrado. Para além disso, no pré-parto deve ser feita a administração de tetraciclina (8mg/kg sid) profilaticamente na água visando reduzir a excreção da bactéria (Angelakis & Raoult, 2010).

Segundo a literatura, a prevenção e o controlo da coxielose e da febre Q está muito relacionado com o parto e as suas condições. Como tal, os rebanhos devem ter locais específicos para as parições e as instalações devem ser cuidadosamente desinfetadas bem como qualquer material utilizado para auxílio do mesmo. Todo e qualquer material visceral proveniente do parto e/ou aborto deve ser destruído por inceneração o mais rapidamente possível de modo a evitar a ingestão por carnívoros silváticos ou domésticos e a contaminação ambiental (Arricau-Bouvery & Rodolakis 2005; Angelakis & Raoult 2010). O estrume deve ser coberto, compostado ou tratado com cal ou com cianamida de cálcio 0,4% antes de ser espalhado nos campos e ter em atenção que o espalhamento do estrume não deve ser feito em dias ventosos (Tissot-Dupont *et al.*, 2004). O tratamento com antibióticos recorrendo a tetraciclina é frequente para minimizar o número de abortos bem como a quantidade de *C. burnetii* libertada

durante o parto (Behymer *et al.*, 1977; Woernle *et al.*, 1985; Berri *et al.*, 2002; Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005). Apesar da infecção por via oral ser considerada uma exceção, a pasteurização a 72° C durante 15 seg. ou a esterilização de leite é recomendada (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005; Angelakis & Raoult, 2010).

A vacinação é a melhor forma de prevenção das infecções por *C. burnetii*. Existem vários tipos de vacinas produzidas quer com células inteiras inativadas em formalina (WCV) quer de resíduos de bactérias extraídas em clorofórmio e metanol (CMR) (Raoult, 1988; Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005; OIE, 2010).

A única vacina comercializada para humanos está disponível apenas para o mercado Australiano, com o nome comercial Q-VAX e é preparada com a estirpe *C. burnetii* Henzerling em fase I inativada em formalina. Apesar de efetiva, já têm sido descritas reações adversas e a vacina está contraindicada em indivíduos que já tenham sido expostos ao agente. A vacinação está dependente da realização prévia de testes cutâneos de sensibilidade (OIE, 2010).

Relativamente às espécies de interesse pecuário tem sido provado que a libertação bacteriana nas placentas e leite é fortemente reduzida em infecções experimentais ou em casos de coxielose, em ovelhas e vacas após a vacinação. Contudo, a opinião não é unânime uma vez que existem autores que defendem que as vacinas de fase I falham na prevenção da excreção da bactéria no leite em vacas infectadas antes da vacinação (Biberstein *et al.*, 1977), sendo o seu efeito mais profilático que terapêutico. Em contrapartida, as vacinas de fase II falham quer na proteção contra a infecção por *C. burnetii*, quer na prevenção da excreção da bactéria através do leite e pela via vaginal (Fishbein & Raoult, 1992; Durand, 1993). Como tal, a vacina de fase II não é eficaz na prevenção de abortos nem na prevenção da excreção através do leite, fezes e fluídos vaginais (Souriau *et al.*, 2003). A vacina de fase II só é efetiva na redução da quantidade excretada, da mesma forma que o tratamento antimicrobiano, não parando, por isso, a excreção de *C. burnetii* através do leite nas vacas (Schmeer *et al.*, 1987; Durand, 1993) e cabras (Fishbein & Raoult 1992). Em França, a vacinação com vacina de fase II é, frequentemente, utilizada após o diagnóstico de coxielose em rebanhos, por ser a única vacina disponível, apesar de não prevenir a excreção do agente (Fishbein & Raoult, 1992; Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005).

As vacinas em fase I são de difícil e perigosa produção e a sua utilização levanta, ainda, a questão de não existir nenhum método capaz de distinguir animais vacinados de animais infetados. Apesar dos avanços tecnológicos é, assim, imperativo o desenvolvimento de uma vacina segura contra a infeção por *C. burnetii*. Desta forma, várias proteínas e LPS têm sido testados para servirem de base para as vacinas de sub-unidade (Zhang & Samuel, 2003). Estudos mais antigos mostraram que proteínas nativas purificadas induzem proteção completa em cobaias e ratinhos (Williams *et al.*, 1981; Zhang *et al.*, 1994). A proteção conferida pelas proteínas nativas recombinantes apenas foi testada em animais de laboratório e este novo modelo vacinal ainda não foi testado em animais domésticos, nem comparado com os modelos de vacinas de fase I existentes (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005).

## **10. Considerações sobre *C. burnetii* e os animais de companhia**

Segundo a literatura, a exposição/infeção por *C. burnetii* tem sido descrita em animais de companhia, nomeadamente em cães e gatos (Marrie *et al.*, 1985), estando, também, documentados pequenos surtos em humanos relacionados com o contacto com estes animais, mais frequentemente gatos (Marrie *et al.*, 1988a, Marrie *et al.*, 1988b; Pinsky *et al.*, 1991; Skerget *et al.*, 2003; Santoro *et al.*, 2004; Dorko *et al.*, 2008; Faix *et al.*, 2008; Porter *et al.*, 2011).

Assim, passando em revista os principais artigos sobre o tema, na Nova Escócia, Marrie *et al.*, (1985) demonstrou a presença anticorpos anti-*C. burnetii* fase I em 6% e anti-*C. burnetii* fase II em 24,1% dos 216 gatos testados, embora nenhum dos 447 cães testados tenha sido positivo. Buhariwalla *et al.*, (1996) descreveu um surto de febre Q numa família, com origem no contacto com uma cadela parturiente infetada; três cachorros morreram pouco tempo após o parto e o quarto acabou por falecer 24 horas após o parto. Um rastreio serológico português em cães recolhidos no canil municipal de Setúbal demonstrou uma seroprevalência de 4,8% nos 104 animais pesquisados (Bacellar *et al.*, 1995). Segundo Boni *et al.*, (1998), em França, dos 355 cães militares testados 35 (9,8%) foram positivos para *C. burnetii* e dois deles apresentaram títulos compatíveis com os títulos de infeções crónicas humanas. No Japão, Nguyen *et al.*, (1997) detetaram anticorpos com títulos de 32 em cães e gatos, obtendo 10,2% de positivos em 589 cães e

15,3% em 150 gatos. Nagoaka *et al.*, (1998) isolaram *C. burnetii* de material proveniente de esfregaços vaginais de gatos, por inoculação de ratinhos. Komiya *et al.*, (2003a) detetaram 44 casos positivos por IFA e quatro por PCR, numa amostra de 310 gatos domésticos e 15 casos positivos por IFA em 36 gatos de rua. Segundo Komiya *et al.*, (2003b) dois cães foram responsáveis por um surto de febre Q num hospital veterinário no Japão. Em 2005, um surto entre os militares dos E.U.A., no Iraque, levou a que fossem testados vários animais e vários fatores de risco; ficou comprovado que quer os cães quer os gatos podiam ter estado na origem deste surto uma vez que apresentavam títulos positivos para *C. burnetii* (Faix *et al.*, 2008). Torina & Caracappa (2006), desenvolveram um estudo, entre 2004 e 2005, que testou vários patógenos associados a picada de carraças, na região da Sicília, Itália, tendo havido evidência serológica para *C. burnetii*, dois positivos em 25 cães testados. No Iraque, Havas & Burkman, (2011) constatarem, através do seu estudo com cães de trabalho militar e cães errantes, que nove dos 165 cães errantes em estudo eram seropositivos para *C. burnetii*. Noutro estudo seroepidemiológico realizado na Austrália, em 301 cães testados, presentes em consultas veterinárias de rotina, foram observadas prevalências entre 16 a 21,8 % (Cooper *et al.*, 2011). Na Hungria, num estudo recente, foram testados 100 cães pastores, 12 cães de caça e 14 cães vadios, de 24 localidades diferentes do sul do país; só um cão pastor foi considerado positivo a *C. burnetii* (Hornok *et al.*, 2013). Andoh *et al.*, (2013) tentaram estabelecer uma correlação entre a infeção humana e a infeção canina, através de carraças colhidas de cães numa área urbana no Japão, tendo os resultados sido negativos.

A patogenia da coxielose nos animais de companhia, assim como nos humanos, é muito similar. Após inalação da bactéria proveniente de uma qualquer fomite, os pulmões parecem ser a principal porta de entrada do organismo na circulação sistémica, o que vai originar o desenvolvimento de um quadro de pneumonia atípica. Se, por outro lado, o agente for ingerido, o fígado é o órgão mais propenso a desenvolver lesões mais graves, nomeadamente a hepatite granulomatosa. O período de incubação é curto e a severidade da patologia tanto maior quanto maior a quantidade de bactérias ingeridas, após exposição a uma estirpe mais virulenta ou quando o organismo é inalado, ao invés de ser ingerido. Esta bactéria tem uma predileção de entrada, replicação e persistência nos macrófagos; contudo, no hospedeiro são encontrados lesados tecidos como o endotélio vascular e respiratório, tubular renal e a serosa epitelial. A vasculite disseminada provoca pneumonia focal hemorrágica, bem como necrose e hemorragias em outros órgãos,

nomeadamente fígado, sistema nervoso central e sistema fagocitário mononuclear. Em casos crónicos, o agente permanece latente até ao parto, sendo libertado na placenta, fluídos dos parto, fezes, urina, e leite. Os animais infetados podem continuar a excretar a bactéria através da urina e fezes (Barr & Bowman, 2006; Greene, 2006).

A infeção de cães e gatos pode ser adquirida pela picada de carraças, pela ingestão de tecidos e leite infetados e através da inalação de partículas aerossolizadas (Greene, 2006; Havas & Burkman, 2011). A infeção por *C. burnetii* nos animais de companhia é, normalmente, subclínica. No entanto, a esplenomegália tem sido descrita na maioria dos casos relatados em cães, como único achado clínico. Febre, anorexia e letargia começam dois dias após a infeção e, em casos de gatos experimentalmente infetados, dura três dias (Greene 2006). Aquando da infeção, o útero e as glândulas mamárias são os locais de eleição determinando a persistência da infeção; manifesta-se com casos severos de aborto e nados mortos em gatos, bem como morte neonatal em cães (Marrie *et al.*, 1988b; Buhariwalla *et al.*, 1996; Hirai & To, 1998; Nagoaka *et al.*, 1998).

No cão e no gato, apesar do diagnóstico ser pouco frequente e de existirem poucos estudos que definam a patologia nestes animais, alguns autores sentiram necessidade de investirem na informação da dinâmica intrauterina de *C. burnetii* e interpretar os achados laboratoriais nos casos de problemas reprodutivos relacionados com a mesma, de modo a perceberem qual a principal sintomatologia nos animais de companhia. Assim, as infeções em cães e gatos podem resultar em várias sintomatologias, nomeadamente aborto, partos prematuros, nados mortos e descendência fraca ou com baixa condição corporal; também pode ocorrer descendência perfeitamente saudável sem sintomatologia, ou sem infeção congénita. Como tal, é de extrema importância perceber a complexidade e as diferentes formas de infeção que se podem desenvolver na placenta e no feto, aquando de nascimentos de descendência com baixa condição corporal. A infeção intrauterina por *C. burnetii* depende, mas não se limita, à virulência da estirpe, resposta imunitária maternal e fetal, severidade das lesões placentárias, possibilidade de contaminação vertical, tempo de gestação e número de fetos infetados.

A infertilidade, subfertilidade e esterilidade são usadas, também, como sintomatologia de coxielose e, na maioria das vezes, não são indicadas como sintomatologia de diagnóstico. A infertilidade e subfertilidade são sinónimos e

determinam a diminuição da capacidade de originar descendência, enquanto que a esterilidade significa a incapacidade, total, de originar descendência (Anderson, 2000). De acordo com estudos recentes, a subfertilidade e a esterilidade são referidas como sintomatologia se ocorrerem enquanto condições independentes ou como uma complicação de coxielose, uma vez que, estudos mais antigos as referem como sintomatologia imprecisa e com pouca base para o diagnóstico (Agerholm, 2013). A endometrite e a metrite determinam inflamação superficial e profunda do útero, no entanto, para se chegar a esta classificação é necessário um estudo histopatológico. Na prática clínica, a inflamação uterina no pós-parto divide-se em metrite puerperal, endometrite clínica, endometrite subclínica e piómetra (Sheldon *et al.*, 2006). Contudo, apesar de descrito por alguns autores, não há estudos suficientes que as comprovem totalmente.

Em medicina veterinária o diagnóstico, como já referido acima, não é muito frequente e menos frequente, ainda, na prática clínica de animais companhia, nomeadamente no cão e no gato. Em termos de rotina, este não é feito nem no diagnóstico de febre da carraça. No entanto, segundo a bibliografia e os estudos feitos até à data, o diagnóstico no cão e no gato é feito em esfregaços vaginais, sangue, soro e, com menos frequência, útero, através de técnicas serológicas como IFA e ELISA, técnicas de pesquisa molecular como o PCR, PCR *nested* e PCR *real-time* e, ainda, isolamento do agente (Nagoaka *et al.*, 1998; Komiya *et al.*, 2003; Coetzer & Tustin 2004; Cooper *et al.*, 2011; Havas & Burkman 2011). Relativamente aos estudos serológicos há que atender à possibilidade de falsos positivos resultantes de reações cruzadas pela exposição a agentes do género *Bartonella*, microrganismos associados a este grupo, sobretudo em gatos (Greene, 2006).

O tratamento nos animais de companhia, assim como nas espécies pecuárias, é feito com base nas tetraciclina, apesar da dosagem não estar, ainda, bem definida. O protocolo utilizado é, por isso, extrapolado a partir do aplicado nos casos da febre da carraça, nomeadamente doxiciclina (10-20 mg/kg de p.v., sid., durante 2-4 semanas) e/ou uma fluoroquinolona, caso a terapêutica com doxiciclina não seja efetiva (Shaw & Day, 2005; Barr & Bowman, 2006; Graham & Taylor, 2012).

A prevenção passa pela adoção de medidas que permitam controlar os comportamentos de risco, nomeadamente o contacto com material abortivo ou do parto e

controle de ectoparasitas. Experimentalmente, já foram vacinados cães com antígenos inativados em formalina quer em fase I quer em fase II, e apesar destes terem desenvolvido resposta humoral e mediada por células contra a bactéria, estas não foram acreditadas porque ou a vacina ou os seus adjuvantes causavam reações muito exuberantes no local da inoculação (Quinn *et al.*, 2002; Coetzer & Tustin, 2004; Greene, 2006).

Em termos de saúde pública, o cão já foi descrito como fonte de infeção para o homem em alguns estudos. Na maioria das vezes, a exposição ao agente ocorreu em ambiente rural, no qual os cães tinham contacto com espécies pecuárias e com o material proveniente do parto. Apesar da maior frequência ser em ambiente rural, os surtos urbanos têm aumentado, em especial em casos relacionados com gatos.

Perante o exposto, pretendeu-se, com o presente trabalho investigar se *C. burnetii* é uma bactéria prevalente em animais de companhia, em contexto urbano.

Para tal foram estabelecidos os seguintes objetivos:

- Determinar se o parto é um fator que influencia a bacteriemia por *C. burnetii*;
- Determinar se a coxielose é um fator desencadeante de aborto;
- Averiguar se a espécie, idade, aptidão reprodutora e contacto com outros animais têm influência na prevalência de *C. burnetii*;
- Investigar o papel dos animais de companhia na transmissão da infeção ao Homem.

## **II. Material e Métodos:**

### **1. Amostras biológicas de animais de companhia**

Para a realização deste estudo foi pedida a colaboração do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (FMV-ULHT), da Coolvet Centro Veterinário, da Vetalcácer Centro Médico Veterinário e do Hospital Veterinário das Mercês. Além dos referidos, foi, também, imprescindível a colaboração e autorização dos proprietários, aos quais foram dados os devidos esclarecimentos sobre o estudo e solicitado o preenchimento de um inquérito com a informação referente ao animal (anexos 1 e 2). Foi, ainda, solicitada a colaboração de criadores de cães através de contacto telefónico, por correio electrónico ou contacto pessoal. Como os animais reprodutores são uma população de difícil acesso, para apelar à colaboração foi divulgado um folheto explicativo sobre a patologia, seus efeitos e objectivos do estudo (anexo 3), tendo sido assegurado o acesso dos criadores aos resultados obtidos e garantida a confidencialidade dos dados recolhidos.

Os contactos foram direccionados para a obtenção de amostras biológicas de cães e gatos, nomeadamente, sangue total e soro, úteros, placentas, fetos abortados ou nados mortos, esfregaços vaginais, tendo o protocolo experimental sido aprovado pela Comissão de Ética da FMV-ULHT. A recolha das amostras iniciou-se em Março de 2012 e terminou em Agosto de 2013, visando, desta forma, abranger as quatro estações do ano.

#### **1.1. Recolha do material**

- **Úteros:**

Os úteros foram provenientes de fêmeas submetidas a intervenções cirúrgicas, ovariectomia, voluntárias por parte dos donos ou em casos de aconselhamento médico veterinário, nomeadamente prevenção de mastocitoma, controlo de animais errantes e infeções uterinas (piómetras). Antes da colheita, os donos foram sempre informados e esclarecidos sobre o destino do sobreproduto e autorizaram a recolha e encaminhamento do mesmo para o presente estudo.

A recolha dos úteros foi feita para sacos estéreis, que foram selados e etiquetados. Os úteros foram armazenados a -20 °C, durante o menor período de tempo possível, tendo sido transportados para o Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas (CEVDI), onde decorreu o trabalho laboratorial, em caixas térmicas e, sempre que possível, em gelo seco. Uma vez no laboratório, as amostras foram armazenadas a -80°C até serem manipuladas. A preservação a -80°C garantiu que, no caso das amostras serem positivas, a viabilidade do agente fosse garantida para posterior tentativa de isolamento.

- **Sangue:**

O sangue foi colhido, maioritariamente, de animais submetidos a intervenções cirúrgicas, enquanto ainda estavam sedados ou, então, de animais que foram submetidos a análises de rotina ou testes de diagnóstico rápido, sempre com autorização dos donos devidamente esclarecidos acerca do estudo e sua finalidade.

A colheita de sangue foi feita através de venopunção com seringa e agulha, na veia jugular ou na veia cefálica. O sangue foi transferido para tubos de EDTA, devidamente identificados e refrigerado a 4 °C até à sua separação. A amostra foi, posteriormente, separada em duas alíquotas, uma de sangue total e uma de plasma, obtida após sedimentação do sangue por efeito da gravidade, que foram armazenadas a -80°C até à sua manipulação.

- **Placentas:**

As placentas pertencentes à amostra em estudo, foram provenientes de animais submetidos a cesarianas. Como anteriormente mencionado para os úteros, antes da colheita os donos foram informados e esclarecidos sobre o destino do sobreproduto e autorizaram a sua recolha.

As placentas foram colhidas para sacos estéreis, selados, identificados e armazenados a -20°C até serem transportados para o CEVDI. Uma vez no laboratório as amostras foram armazenadas a -80°C até serem manipuladas.

- **Esfregaços vaginais:**

Os esfregaços vaginais foram obtidos de fêmeas parturientes ou abortadas, através da realização de uma zaragatoa nos quinze dias seguintes ao parto ou aborto. Os esfregaços vaginais foram realizados com zaragatoas estéreis secas, com movimentos rotacionais e de forma gentil, no sentido caudocranial sem forçar, retirando a zaragatoa assim que se sentisse resistência de forma a não lesionar as mucosas. As amostras foram identificadas com os dados do animal, acondicionadas numa caixa refrigerada, transportadas para o laboratório e armazenadas a -20 °C até serem manipuladas. Aos proprietários foi solicitado o preenchimento um pequeno formulário, de modo a recolher o número máximo de informações sobre o animal.

## **1.2. Dissecção e preparação das amostras**

A dissecção de todo o material em estudo (úteros, placentas e fetos) foi realizada em laboratório de nível de segurança II, numa câmara de segurança biológica (BSL2) usando algumas das medidas de proteção individual de nível III (dois pares de luvas e máscara). O par de luvas exterior destinou-se, apenas, à manipulação no interior da câmara sendo removido sempre que se pretendeu sair da mesma ou quando contaminado com material biológico. Todo o material utilizado na dissecção, na limpeza do interior da câmara, luvas do par exterior e restos biológicos foram contentorizados para sair da câmara BSL2 e, posteriormente, autoclavados para inativação. Os contentores e tubos com amostras foram encerrados, tendo-se procedido à descontaminação da sua superfície exterior com a aplicação do desinfetante germicida TF9, aguardando-se 5-10 min. para que atuasse, antes de serem removidos da câmara.

- **Úteros e placentas:**

1. Dissecou-se a peça em placa de petri ou tabuleiro metálico estéril de dimensão compatível, cortando-se o órgão no sentido longitudinal, para expor a parte interna;
2. Adicionaram-se 5 mL de NaCl 0,9%;
3. Procedeu-se à raspagem da parede uterina com o bisturi;

4. Pipetaram-se 0,5 mL do conteúdo da raspagem para três tubos Nunc stock e conservou-se a  $-80^{\circ}\text{C}$ ;
5. Centrifugou-se o tubo destinado à extração de ADN à temperatura ambiente (t. a.) durante 10 min. a 10.000 g;
6. Removeu-se o sobrenadante, deixando o depósito sólido, no máx. 25 mg, e procedeu-se de acordo com o descrito para a extração de ADN de tecido.

- **Amostras atípicas - Fetos e Nados mortos:**

1. Dissecou-se o cadáver, em placa de petri ou tabuleiro metálico estéril de dimensão compatível, com uma incisão ventral a todo o comprimento para expor os órgãos internos, nas cavidades torácica e abdominal;
2. Removeu-se uma amostra de fígado, baço, pulmão e conteúdo gástrico para tubos Nunc stock e conservou-se a  $-80^{\circ}\text{C}$ ;
3. Prepararam-se dois tubos Eppendorff para extrair ADN, um com uma sub-amostragem dos órgãos removidos (fígado, baço e pulmão), no máx. 25 mg, e outro com conteúdo gástrico, no máx. 400 $\mu\text{L}$ , e procedeu-se de acordo com o descrito para a extração de ADN de tecidos e de fluídos orgânicos.

## **2. Extração de ADN**

### **2.1. Fundamento teórico**

Os protocolos de extração de ADN têm como fundamento a lise das células com a libertação de todo o seu conteúdo (nomeadamente proteínas, lípidos, polissacarídeos, ácidos nucleicos, moléculas orgânicas de baixo peso molecular e iões) e posterior purificação do ADN, com o intuito de eliminar todos os componentes intracelulares que possam interferir com a reação de PCR. A metodologia adotada para a extração de ADN pode variar consoante o material biológico em estudo e a finalidade da investigação, podendo ser realizada de forma manual, semi-automática ou automática.

No presente trabalho a extração de ADN foi realizada por dois métodos distintos, consoante as amostras em processamento. Assim, foi utilizado o extrator automático MagCore®HF16 (RBC Bioscience Corp., Taiwan), usando para as amostras de sangue e conteúdo gástrico o MagCore®Genomic DNA Whole Blood kit (RBC Bioscience Corp., Taiwan) e para as amostras de tecidos uterinos, placentários e fetais o MagCore®Genomic DNA Tissue kit (RBC Bioscience Corp. Taiwan). Neste sistema, a lise celular é promovida por ação enzimática, com adição de proteinase K, recorrendo, também, à utilização de um detergente para potenciar a reação. A purificação de ADN é feita pela ação de microesferas magnéticas às quais este se liga, sendo o complexo lavado e, posteriormente, atraído e depositado na base do tubo através do efeito de um íman; os outros compostos em suspensão são aspirados e removidos progressivamente em lavagens consecutivas. As zaragatoas foram processadas manualmente com recurso ao QIAamp®DNA Mini kit (Qiagen®, Alemanha). À semelhança do sistema anterior, a lise é, também, enzimática; contudo, a purificação do ADN é feita com recurso a colunas com membrana de sílica, à qual este se liga enquanto tudo o resto é arrastado nas soluções de lavagem contendo álcool. O ADN é, finalmente, eluído com recurso a uma solução tampão. Este método de purificação é extremamente eficaz, produzindo uma grande concentração de ADN purificado (Moore & Dowhan, 2002).

## **2.2. Procedimento experimental**

Todas as manipulações prévias à digestão da amostra voltaram a ser realizadas em câmara de segurança biológica BSL2. Em cada leva de material biológico preparado para extração de ADN (11 a 15 amostras) foi incluída uma amostra controlo negativo, constituída, apenas, pelos reagentes utilizados, para monitorizar a ocorrência de contaminação cruzada durante todo o processo.

Consoante o tipo de material biológico assim foram seguidos diferentes protocolos de extração de ADN, tanto manuais como automáticos, de acordo com o descrito em seguida.

### **• Extração automática de ADN de tecidos com o MagCore®Genomic DNA Tissue kit**

1. Adicionaram-se a cada microtubo com as amostras uterinas, placentárias, órgãos de fetos/nados mortos, 380µL de tampão GT e 40µL de Proteinase K;
2. Incubaram-se os tubos a 56° C durante 24 a 48 h até digestão dos tecidos;

3. Incubaram-se as amostras a 90° C, durante 30 min.;
4. Efetuou-se um *spin-down*; caso existisse precipitado sólido insolúvel, para evitar a obstrução das pontas do MagCore, transferiu-se o sobrenadante para uma coluna fornecida pelo kit e centrifugou-se à velocidade máxima durante 5 min. para obter uma solução límpida no tubo coletor a usar na extração;
5. Pipetaram-se 400µL de cada amostra a extrair para um tubo fornecido pelo kit;
6. Preparou-se o MagCore montando, nos respectivos suportes, os tubos de eluição, as pontas, os tubos contendo as amostras e os *strips* com os reagentes;
7. Correu-se o programa 401 no MagCore (especificações: amostra inicial de 400 µL, eluição em TE, num volume final de 100µL).

- **Extração automática de ADN de sangue ou de outros fluídos biológicos, com o MagCore® Genomic DNA Whole Blood kit**

1. Homogeneizou-se a amostra com uma pipeta de Pasteur e pipetaram-se 400µL para o tubo da amostra fornecido pelo kit;
2. Adicionaram-se 40 µL de Proteinase K;
3. Preparou-se o MagCore com os tubos de eluição, as pontas os tubos da amostra e os *strips* contendo os reagentes;
4. Correu-se o programa 102 no MagCore (especificações: amostra inicial de 400 µL, eluição em TE num volume final de 100µL).

- **Extração manual de ADN de esfregaços vaginais com o QIAamp® DNA Mini kit**

1. Removeu-se cada zaragatoa do tubo de transporte e cortou-se com uma tesoura estéril a ponta de algodão diretamente para um microtubo de 1,5 mL;
2. Adicionaram-se a cada tubo, 400µL de PBS, 400µL de tampão AL e 20µL de Proteinase K;
3. Homogeneizou-se a amostra no vortex durante 10 seg.;

4. Incubaram-se os tubos a 56° C, durante 24h;
5. Efetuou-se um *spin-down*;
6. Adicionaram-se 400µL de Etanol (96-100%) e procedeu-se a alguma agitação ao vortex, durante 10 seg.; voltou-se a repetir o *spin-down*;
7. Transferiu-se a amostra em duas vezes (máx. 650µL de cada vez) para uma coluna de sílica fornecida pelo kit e centrifugou-se, durante 1 min., a 8.000g. de cada vez; descartou-se o tubo coletor e reposicionou-se a coluna num novo tubo coletor;
8. Adicionaram-se 500µL do tampão AW1, centrifugou-se, durante 1 min., a 8.000 g, descartou-se o tubo recolector e colocou-se a coluna num novo tubo;
9. Adicionaram-se 500µL do tampão AW2 e centrifugou-se durante 3 min. a 14.000 g. Descartou-se o tubo coletor e, finalmente, transferiu-se a coluna para um microtubo;
10. Adicionaram-se 100µL do tampão AE e incubou-se 1 min. à temperatura ambiente (t. a.); centrifugou-se durante 1 min. a 8.000 g, para eluir o ADN e descartou-se a coluna.

### **Quantificação de ADN extraído por espetofotometria**

A concentração de ADN das amostra foi medida no espetofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, E.U.A.) com a leitura a ser feita no comprimento de onda de 260nm. A leitura da absorvância foi realizada num volume de 1µL de ADN. Como a alteração de temperatura resultantes do congelamento e descongelamento sucessivos provocam quebras nas cadeias de ADN, as amostras foram mantidas a 4 °C até serem testadas.

## **3. Reação de polimerase em cadeia (PCR)**

### **3.1. Fundamento teórico**

A reação de polimerase em cadeia ou a reação em cadeia de polimerase ou *Polymerase Chain Reaction* (PCR) consiste em reações de amplificação sucessivas que visam produzir cópias de ADN de modo exponencial. Assim, a partir de uma molécula de ADN, obtêm-se, no primeiro ciclo de amplificação, duas cópias, no segundo quatro, no terceiro oito e, assim,

sucessivamente (Joshi & Deshpande, 2011). A reação é conseguida através de ciclos térmicos, com recurso a uma polimerase termoestável, ou seja, enzima que mesmo a temperaturas elevadas mantém a sua capacidade de polimerizar ácidos nucleicos através dos seus monómeros (nucleótidos) numa duplicação semiconservativa. São, também, fornecidos os elementos estruturais (nucleótidos), um par de fragmentos de ADN, conhecidos como *primers* ou oligonucleótidos iniciadores que, ao ligarem-se às extremidades da reação alvo a amplificar, vão servir de suporte para a ligação dos nucleótidos que irão construir a nova cópia (Joshi & Deshpande, 2011).

Assim, uma reação de PCR típica inclui o ADN alvo, a polimerase, dois *primers*, os elementos estruturais ou desoxiribonucleósidos trifosfatos (dNTP's), tampão de reação e ião magnésio. Para que a amplificação ocorra a mistura reacional é colocada num termociclador, e submetida a ciclos de temperaturas por períodos de tempo pré-definido, denominados por ciclos de amplificação. A cada ciclo de amplificação a quantidade de ADN alvo, ou *amplicon*, presente na solução de reação é duplicada (Van Pelt *et al.*, 2008). Na maioria dos protocolos, cada ciclo de amplificação compreende três fases distintas e sequenciais: desnaturação da cadeia dupla, o *annealing* ou ligação dos *primers* e a extensão das novas cadeias (Promega, 2012). Na desnaturação a cadeia dupla do ADN alvo é separada ao ser sujeita a temperaturas de 94 °C, durante 15 seg. a 2 min., originando cadeias simples que podem, então, ser replicadas pela ADN polimerase. No *annealing* a temperatura diminui para 40-60 °C, durante cerca de 15-60 seg., para que os *primers* formem associações estáveis, por complementaridade, com o ADN desnaturado. Na extensão a temperatura é aumentada para o intervalo de funcionamento ótimo da ADN polimerase, para que ocorra a síntese de novo ADN. Para a maioria das ADN polimerases termoestáveis, a temperatura ótima de atuação está entre os 70 °C e os 74 °C, durante 1 a 2 min.. Após cada ciclo inicia-se um novo, sendo comum uma reação de PCR ter 20 a 40 ciclos de amplificação (Promega, 2012).

No trabalho desenvolvido, a pesquisa de *C. burnetii* foi feita com recurso a um protocolo de PCR *nested* (Lorenz *et al.*, 1998). Esta é uma variante da amplificação convencional, na qual duas reações de PCR são efetuadas de modo sequencial, aumentando a sensibilidade da técnica através da quantidade final de ADN alvo amplificado. Em PCR *nested* são utilizados dois pares de *primers*, ao invés de um só, em que o primeiro par, *primers* externos, é utilizado na primeira reação de PCR e têm como alvo um fragmento de ADN de maior comprimento; o segundo par, *primers* internos, é utilizado na segunda reação de PCR

ligando-se ao produto da primeira, ou seja, ao fragmento amplificado, promovendo uma nova ronda de amplificação de um segundo fragmento, de menor dimensão (Yourno, 1992). Acrescenta-se que a sensibilidade da técnica para a pesquisa de *C. burnetii* foi, ainda, incrementada pelo facto de a sequência alvo estar localizada num gene que possui múltiplas cópias do genoma desta bactéria, denominado *IS1111* ou *transposonlike repetitive region* (Lorenz *et al.*, 1998). Por seu turno, a especificidade foi, também, incrementada pelo facto dos ciclos iniciais decorrerem em *touchdown*. Usando temperaturas de *annealing* altas e próximas da temperatura de *melting* ou dissociação dos primers, aumenta-se a especificidade da sua ligação nos primeiros ciclos de reacção, reduzindo-se a possibilidade de amplificações inespecíficas de outros fragmento que não o fragmento alvo.

### 3.2. Procedimento experimental

Para a realização do PCR *nested* para pesquisa de *C. burnetii*, nas amostras em estudo, procedeu-se de acordo com o que seguidamente se descreve:

#### **Etapa 1: Preparação da *master mix* (ADN e ARN *free*)**

A preparação da solução de *master mix* foi feita numa sala isolada, na qual não se manipula ADN ou ARN e para a qual não é transportado nada que seja utilizado noutros laboratórios onde se manipule ADN e/ou ARN, nomeadamente batas, luvas, cadernos, suportes de plástico, etc..

A câmara destinada à preparação da *master mix*, foi previamente esterilizada, durante 15 min. com radiação ultra-violeta (UV).

Para a reacção de PCR foram utilizados reagentes do Master Taq Kit (5 Prime, Reino Unido), atendendo às concentrações recomendadas pelo fabricante. Na primeira reacção, com volume final de 50 µL, foram colocados os seguintes reagentes: água bidestilada, *enhancer* (1x), solução tampão (1x), dNTP mix (0,2 mM), solução de magnésio (1,5 mM), *primers* Trans 1 e Trans 2, 1µM de cada e Taq polimerase (2,5U). Na segunda reacção são utilizados os mesmo reagentes com excepção da solução de magnésio que não se utiliza, sendo o seu volume compensado, com água bidestilada, e os *primers* que passam a ser o Trans 3 e Trans 4 (1µM de cada).

Em cada amplificação foram incluídos, na 1ª reação, um controlo positivo e um negativo e, na reação *nested*, um controlo positivo e dois negativos.

As sequências dos *primers* utilizados são apresentadas na tabela 3.

**Tabela 3:** Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados, para a amplificação de um fragmento da região IS1111 (Lorenz *et al.*, 1998).

| Designação dos <i>primers</i> | Sequência (5'-3')             | Dimensão do fragmento amplificado |
|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| Trans 1                       | TAT GTA TCC ACC GTA GCC AGT C | 687                               |
| Trans 2                       | CCC AAC AAC ACC TCC TTA TCC   |                                   |
| Trans 3                       | GTA ACG ATG CGC AGG CGA T     | 243                               |
| Trans 4                       | CCA CCG CGC TCG CTA           |                                   |

## Etapa 2: Adição do ADN

A adição da amostra foi realizada no laboratório principal, tendo todas as pipetagens sido realizadas usando pontas descartáveis com filtro, de forma a evitar a formação de aerossóis. Os controlos da reação foram sempre aplicados depois da manipulação das amostras.

Na primeira reação a adição de ADN das amostras foi feita com o volume necessário para se obter uma concentração de 300 ng de ADN. Na segunda reação foram adicionados 10 µL de produto da primeira amplificação.

Na primeira reação de PCR, para além do tubo do branco, ao qual foram previamente adicionados 5 µL de água bidestilada, na sala da *master mix*, foi incluído um tubo de controlo positivo ao qual se juntaram 5 µL de ADN de *C. burnetii* estirpe Nine Mile.

Na segunda reação de PCR ou *nested*, para além do tubo do branco, com 5 µL de água bidestilada, conforme mencionado, foi incluído outro tubo controlo negativo, designado por “branco do branco”, ao qual se juntaram 5 µL do tubo do branco da 1ª reação, e o tubo controlo positivo, ao qual se juntaram 5 µL de ADN de *C. burnetii* estirpe Nine Mile.

### Etapa 3: Amplificação

A reação de PCR foi realizada num termociclador C1000™ Thermal Cycler (BioRad, Califórnia, USA), de acordo com as condições da tabela 4.

**Tabela 4:** Condições de amplificação utilizadas para pesquisa de *C. burnetii* (Lorenz *et al.*, 1998).

| Nº ciclos | Temperatura              | Tempo   |
|-----------|--------------------------|---------|
| 1         | 94°C                     | 2 min.  |
| 5         | 94°C                     | 30 seg. |
|           | 77° a 69°C (-2°C/ciclo)* | 15 seg. |
|           | 77°C                     | 1 min.  |
| 38        | 94°C                     | 30 seg. |
|           | 67°C                     | 30 seg. |
|           | 77°C                     | 1 min.  |
| 1         | 77°C                     | 1 min.  |
| 1         | 4°C                      | ∞       |

\* Descida de 2°C na temperatura de annealing a cada novo ciclo, começando por 77°C no primeiro ciclo

## 4. Visualização dos produtos de PCR

### 4.1. Fundamento teórico

A electroforese consiste na separação dos fragmentos de ADN de acordo com a sua migração num campo elétrico, tendo como base que as moléculas quando são colocadas num campo elétrico migram de forma inversamente proporcional à sua dimensão para um polo positivo ou negativo tendo em conta a sua carga elétrica. A eletroforese pode ser utilizada com o intuito de investigar o peso molecular de uma amostra de ADN ou para separar ou purificar um fragmento da amostra. Por ação de campo elétrico, as moléculas de ADN migram para o eletrodo positivo devido a possuírem carga negativa, que lhe é conferida pelos grupos fosfato.

Para que seja possível a análise dos resultados de eletroforese, a visualização do ADN faz-se por adição ao gel de um agente intercalante, brometo de etídeo, substituído atualmente por substâncias mais inócuas como o GelRed™, de forma a que haja emissão de fluorescência aquando da irradiação por luz ultravioleta. A migração da amostra é comparada com a de um marcador de peso molecular conhecido podendo, também, fazer-se migrar um controlo positivo com o peso molecular em estudo (Prescott *et al.*, 2005).

## **4.2. Procedimento experimental**

A confirmação da presença de ADN alvo amplificado foi efetuada por electroforese em gel de agarose a 1,5 %, em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA)1×. Ao gel foi incorporado GelRed™(1µL por cada 30 mL de gel), para posterior visualização do ADN. A migração foi efetuada numa solução tampão de TBE com uma concentração 1×, a 100 V, durante 30 minutos. A todas as amostras, antes de serem aplicadas no gel, foi adicionado azul de bromofenol na proporção de 1µL para 5 µL produto de PCR.

As amostra consideradas positivas deviam apresentar, um fragmento único, alinhado com a migração do controlo positivo, com uma dimensão de 243 pb calculada com base na migração do ADN marcador. Todas as amostras consideradas positivas ou suspeitas foram preparadas para sequenciação. Nestas amostras foi efetuada a quantificação de ADN num espetofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, EUA).

## **5. Sequenciação dos produtos de PCR**

### **5.1. Fundamento teórico**

A sequenciação tem como objetivo determinar a ordem dos nucleótidos existentes na molécula de ADN amplificada. Esta reação tem um fundamento idêntico à de PCR. No entanto, nas reações de sequenciação são utilizadas amostras de ADN já amplificado (produto de PCR, após purificação para eliminar os reagentes da reação), bases azotadas marcadas com fluorocromos e um *primer* por reação, o que significa que são necessárias duas reações de sequenciação para se obter a sequência de ambas as cadeias de ADN (Figueiredo *et al.*, 2003).

Entre os métodos existentes, o mais utilizado é o “método dideoxi”, também conhecido por “método de terminadores de cadeia” ou “método de Sanger”, em homenagem a Frederick Sanger, investigador que, juntamente com a sua equipa, desenvolveu este método. Este baseia-se na terminação prematura da síntese de ADN resultante da adição de dideoxiribonucleótidos – ddG, ddA, ddC e ddT - sem grupo hidroxilo no carbono 3', cada um marcado com um fluorocromo diferente. A síntese de ADN inicia-se a partir do *primer* e a cada incorporação nucleotídica a síntese da restante cadeia fica bloqueada. No final de cada reação existem inúmeros fragmentos de ADN com dimensões distintas, todos eles terminados num dideoxiribonucleótido fluorescente (A, G, C ou T). Estes fragmentos são separados por eletroforese capilar, tendo como base a sua dimensão, sendo identificado o dideoxiribonucleótido terminal, através da incidência de um feixe de laser e leitura da fluorescência emitida (University of Washington, School of Pharmacy, 2013). Assim, é possível identificar toda a sequência de nucleótidos do fragmento amplificado. Estes resultados são analisados com software apropriado e apresentados em cronogramas ou fluorogramas de sequenciação.

## **5.2. Procedimento experimental**

Todas as amostras que apresentaram fragmentos de ADN de peso molecular equivalente ao do controlo positivo foram purificadas com recurso ao JETquick kit (Genomed®, Alemanha) e sequenciadas para confirmação da identidade, usando os primers internos (T3 e T4) e o Bigdye V1.1 kit (Applied Biosystems, Alemanha), de acordo com as indicações do fornecedor.

### **1ª Etapa - Purificação dos produtos de PCR, JETquick kit (Genomed®, Alemanha);**

1. Colocou-se o tampão TE a 67° C;
2. Para 50µL de amostra adicionaram-se 200µL de H1 e homogeneizou-se com a pipeta;
3. Transferiu-se a solução para um tubo coletor com coluna;
4. Centrifugou-se durante 1 min. a 12.000 g;
5. Descartou-se o líquido do tubo coletor e voltou-se a recolocar a coluna;

6. Adicionaram-se 500µL de H2 diretamente na coluna sem a danificar;
7. Centrifugou-se durante 1 min. a 12.000 g;
8. Descartou-se o líquido do tubo coletor, recolocou-se a coluna e centrifugou-se 1 min. à velocidade máxima;
9. Transferiu-se a coluna para um microtubo de 1,5 mL e adicionaram-se 30µL de tampão TE. Incubou-se 1 min. à t.a. e centrifugou-se a 12.000 g durante 2 min.;
10. Doseou-se a concentração de ADN purificado num espetofotômetro Nanodrop™ (ThermoScientific, E.U.A).
11. Caso necessário, diluiu-se a amostra a sequenciar, de forma a obter uma concentração final de 12 ng/µL.

**2ª Etapa: Preparação da solução da reação; Bigdye V1.1 kit (Applied Biosystems, Alemanha);**

Na câmara destinada à preparação da *master mix*, previamente esterilizada com radiação UV durante 15 min., foi pipetado o volume total necessário de cada reagente para um tubo Eppendorf de 1,8 mL na quantidade e ordem indicadas pelo fabricante (tabela 5).

**Tabela 5:** Quantidade e ordem dos reagentes usados na reação de sequenciação.

| Reagentes para 10 µL de reação final |                      |
|--------------------------------------|----------------------|
| Descrição                            | Quantidade (µL/tubo) |
| Água bidestilada                     | 3,8                  |
| Solução tampão                       | 3,5                  |
| <i>Master mix (BigBye)</i>           | 0,7                  |
| Solução de <i>primer</i> (4 pmol/µL) | 1                    |

**3ª Etapa : Adição do ADN**

A adição dos produtos de PCR foi realizada no laboratório principal. Para cada amostra foi adicionado 1µL de produto de PCR purificado e previamente diluído a 12ng/µL.

#### **4ª Etapa: Reação de Sequenciação**

A amplificação foi feita em 25 ciclos de desnaturação a 96 °C, durante 10 seg., ligação dos *primers* a 50 °C, durante 5 seg., e extensão a 60 °C, durante 4 min..

#### **5ª Etapa: Análise dos produtos de sequenciação**

A separação dos fragmentos por electroforese capilar e a análise dos produtos de sequenciação foi feita na Unidade de Utilização Comum do INSA.

Para cada amostra foi feito um alinhamento das sequências obtidas com cada um dos *primers*. A sequência consenso foi inserida na base de dados GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi)) para que pudesse ser feita a sua identificação.

### **6. Imunofluorescência Indireta**

#### **6.1. Fundamento teórico**

A Imunofluorescência indirecta (IFA) é uma das provas serológicas mais usadas no diagnóstico laboratorial. Denominada, também, por técnica de dupla camada, a IFA é utilizada na detecção de anticorpos no soro através da utilização de antígeno fixado numa lâmina, onde é aplicada a amostra de soro ou plasma em estudo. A ligação do anticorpo ao antígeno é, então, revelada com aplicação de um anticorpo secundário marcado com um fluorocromo, denominado conjugado, que apresenta especificidade para uma classe de anticorpo que se pretende pesquisar na amostra (geralmente IgA, M, ou G). O complexo antígeno-anticorpo-conjugado é revelado quando o fluorocromo é excitado pela luz ultravioleta emitindo fluorescência. Entre os fluorocromos mais utilizados encontra-se a fluoresceína (FICT) e a rodamina (TRICT).

#### **6.2. Procedimento experimental**

O soro/plasma foi, previamente, separado das restantes frações do sangue e congelado, conforme mencionado anteriormente. Neste trabalho, foram pesquisados anticorpos

circulantes IgG anti-*C. burnetii*, tendo sido usadas lâminas antigenadas comerciais produzidas com as estirpes Nine Mile em fase I e fase II (Fuller, Califórnia, E.U.A.). Assim, as amostras foram estabilizadas à temperatura ambiente e procedeu-se da seguinte forma:

1. Fizeram-se diluições seriadas de 1:25 e 1:50 das amostras em PBS, começando pela diluição 1:25. Para fazer a diluição 1:50, juntaram-se, no poço respetivo, 50 µL da diluição anterior e 50 µL de PBS;
2. Estabilizaram-se as lâminas de antigénio, que são fornecidas no kit e que estão refrigeradas, durante 10 min. à t. a.;
3. Aplicaram-se em dois poços da lâmina os controlos da reação - controlo negativo (PBS) e positivo (soro controlo positivo, fornecido pelo kit);
4. Aplicaram-se em cada poço restante, 10 µL de amostra na diluição 1:50;
5. Incubou-se a lâmina em câmara húmida a 37 °C, durante 30 min. ;
6. Retiraram-se as amostras da lâmina, com o esguicho de PBS;
7. Procedeu-se à lavagem das lâminas em PBS com agitação, durante 5 min. Repetiu-se a lavagem;
8. Passou-se a lâmina por água bidestilada e deixou-se secar;
9. Aplicou-se uma gota do conjugado anti-IgG de cão ou gato, consoante o tipo de amostra a analisar; no controlo positivo adicionou-se o conjugado do kit;
10. Incubou-se a lâmina novamente em câmara húmida a 37 °C, durante 30 min. ;
11. Repetiu-se os passos de lavagem 6 a 8;
12. Montou-se a lamela em cima da lâmina, usando o meio de montagem fornecido pelo kit; caso não se procedesse logo à leitura das lâminas, estas deviam ser armazenadas a 4 °C;
13. Observou-se a lâmina ao microscópio de fluorescência. Numa amostra positiva os microrganismos estavam corados de verde fluorescente contrastando com o vermelho acastanhado do fundo; numa amostra negativa todo o campo visual apresentava-se apenas, vermelho acastanhado.

14. Nas amostras positivas, procedeu-se a novas diluições seriadas (1:100; 1:200; 1:400; 1:800 e assim sucessivamente) para se determinar o título final dos anticorpos, ou seja, a última diluição considerada positiva.

## **7. Análise Estatística dos Resultados**

A análise dos dados foi feita utilizando o programa SPSS Statistics versão 20, para Macintosh, através de uma base de dados criada inicialmente em formato Excell, na versão mac 11.

Para efeitos estatísticos foi feita uma análise descritiva, para caracterização das variáveis da amostra, com base nas médias, desvios padrões e frequências. Para, correlacionar os resultados obtidos com os objetivos propostos, acima descritos, foi feita a análise das frequências e o cruzamento de variáveis. Em seguida, realizou-se uma análise inferencial com base no teste do Qui-quadrado de associação, dado as variáveis utilizadas serem maioritariamente qualitativas. Esta teve o intuito de estabelecer uma relação entre os resultados obtidos, através da pesquisa de anticorpos anti-*C. burnetii* em fase I e fase II, e os fatores considerados como predisponentes à coxielose, nomeadamente, parto, aborto, contacto com outros animais e tipo de alojamento.

### III. Resultados:

#### 1. Caraterização das amostras recolhidas

As amostras utilizadas neste estudo incluíram sangue (N= 167; 60,7%), soro/plasma (N=149; 54,2%), placenta (N= 24; 8,7%), útero (N= 176; 64%), esfregaço vaginal (N= 68; 24,7%) e outras amostras isoladas que foram designadas de atípicas, como fetos e nados mortos (N= 4; 1,5%), perfazendo um total de 588 amostras. Em 152 animais foi recolhida mais de uma amostra, nomeadamente útero/sangue/soro (N=139), útero/placenta/sangue/soro (N=11) e útero/placenta (N=2). Para ambas as espécies o material biológico dominante foi útero e sangue e soro. Ainda, foi obtido igual número de placentas em cães e gatos; as zaragatoas provenieram, essencialmente, de cães (tabela 6). Nestes últimos, não foi possível a recolha de nenhuma amostra biológica para além da zaragatoa vaginal.

**Tabela 6:** Número total de amostras manipuladas para pesquisa de *C. burnetii* na população em estudo.

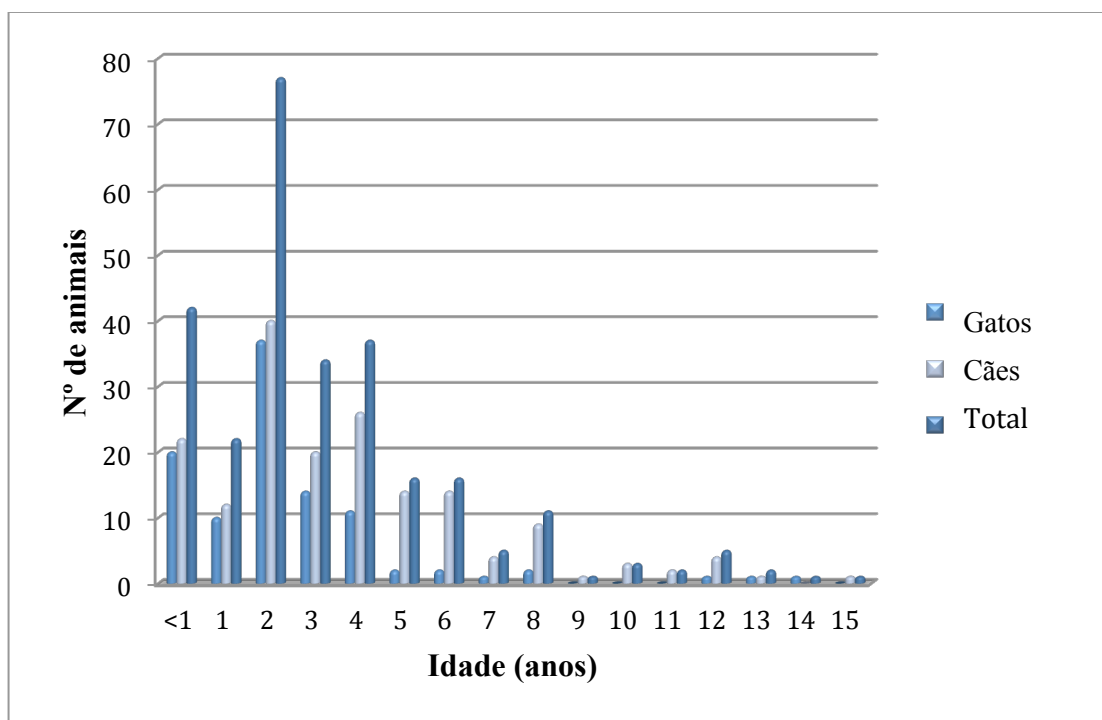
|       | Número de amostras |          |        |                 |       |           | Total |
|-------|--------------------|----------|--------|-----------------|-------|-----------|-------|
|       | Amostras atípicas  | Placenta | Sangue | Soro/<br>Plasma | Útero | Zaragatoa |       |
| Cães  | 4                  | 12       | 78     | 69              | 82    | 65        | 310   |
| Gatos | 0                  | 12       | 89     | 80              | 94    | 3         | 278   |
| Total | 4                  | 24       | 167    | 149             | 176   | 68        | 588   |

#### 2. Caraterização da amostra

A pesquisa de *C. burnetii* foi realizada em amostras provenientes de 275 animais de companhia, 173 (62,9%) cães e 102 (37,1%) gatos. Esta amostragem incluiu animais do género feminino com idades compreendidas entre menos de um (N=42; 15,3%) e 15 anos (N=1; 0,4%), sendo a idade mais frequente os dois anos (N=77; 28%); a média etária foi de 3,87 anos (DP= 2,763) (tabela 7 e gráfico 1).

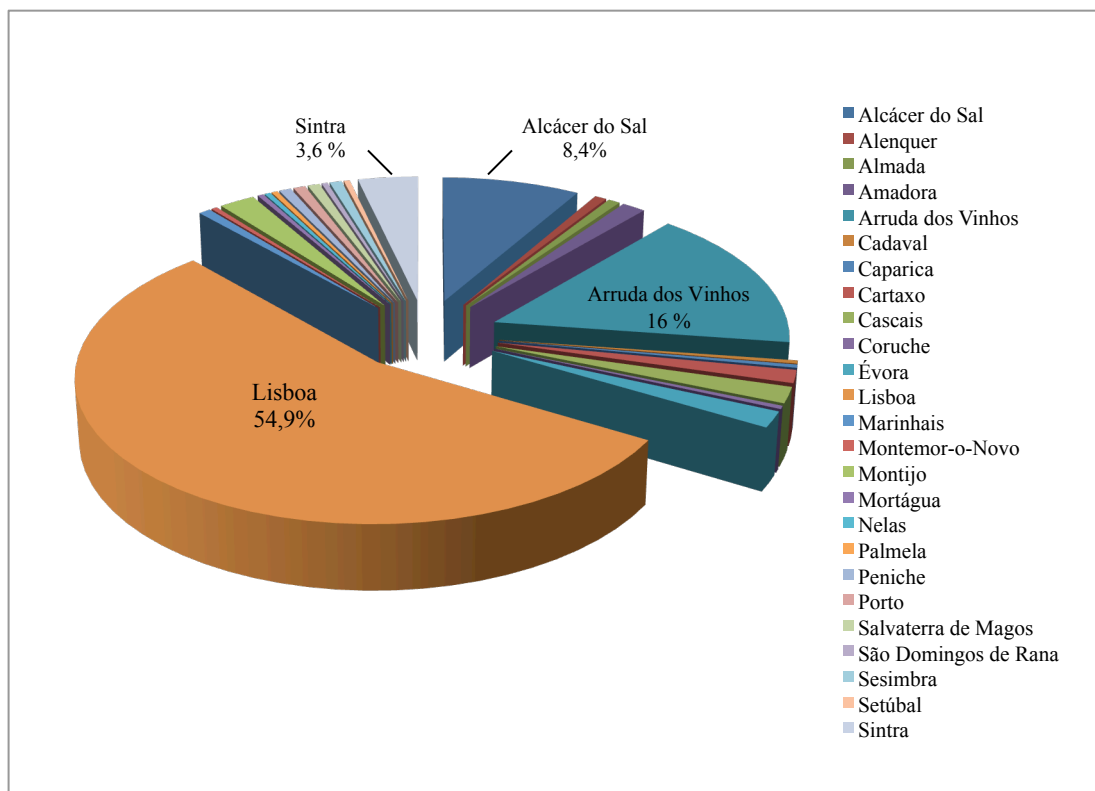
**Tabela 7:** Idade dos animais incluídos no estudo;

| Idade        | Número de animais |            |            |
|--------------|-------------------|------------|------------|
|              | Cães              | Gatos      | Total (%)  |
| <1           | 22                | 20         | 42 (15,3)  |
| 1            | 12                | 10         | 22 (8,0)   |
| 2            | 40                | 37         | 77 (28)    |
| 3            | 20                | 14         | 34 (12,4)  |
| 4            | 26                | 11         | 37 (13,5)  |
| 5            | 14                | 2          | 16 (5,8)   |
| 6            | 14                | 2          | 16 (5,8)   |
| 7            | 4                 | 1          | 5 (1,8)    |
| 8            | 9                 | 2          | 11 (4,0)   |
| 9            | 1                 | 0          | 1 (0,4)    |
| 10           | 3                 | 0          | 3 (1,1)    |
| 11           | 2                 | 0          | 2 (0,7)    |
| 12           | 4                 | 1          | 5 (1,8)    |
| 13           | 1                 | 1          | 2 (0,7)    |
| 14           | 0                 | 1          | 1 (0,4)    |
| 15           | 1                 | 0          | 1 (0,4)    |
| <b>Total</b> | <b>173</b>        | <b>102</b> | <b>275</b> |



**Gráfico 1:** Idade dos animais incluídos no estudo.

As amostras foram colhidas em 25 localidades, com Lisboa a liderar na origem da maioria dos animais estudados (N=151; 54,9%), seguindo-se Arruda dos Vinhos (N=44; 16%), Alcácer do Sal (N=23; 8,4%) e Sintra (N=10; 3,6%). Nas restantes localidades o número de animais não foi superior a seis (2,2%), valor que, apenas, foi registado para o Montijo (gráfico 2).



**Gráfico 2:** Distribuição dos animais em estudo por localidade de origem.

A grande maioria dos cães incluídos no estudo tinham dono e estavam alojados em ambiente interior, embora com acesso ao exterior, sendo os passeios as principais atividades exteriores. Por seu turno, os gatos vieram, sobretudo, de associações e abrigos, estando alojados em ambiente exterior e, em alguns casos, tratando-se mesmo de animais errantes (tabelas 8 e 9).

**Tabela 8:** Tipo de alojamento e situação dos animais em estudo.

|       | Número de animais |          |                     |    |          |         |    |
|-------|-------------------|----------|---------------------|----|----------|---------|----|
|       | Alojamento        |          |                     |    | Situação |         |    |
|       | Exterior          | Interior | Interior e Exterior | SD | C/ dono  | S/ dono | SD |
| Cães  | 47                | 44       | 69                  | 13 | 147      | 19      | 7  |
| Gatos | 47                | 36       | 11                  | 8  | 45       | 51      | 6  |
| Total | 94                | 80       | 80                  | 21 | 192      | 70      | 13 |

SD- sem dados

**Tabela 9:** Registo de atividade fora do local de habitação.

|       | Número de animais |      |           |               |    |
|-------|-------------------|------|-----------|---------------|----|
|       | Atividade         |      |           |               | SD |
|       | Passeio           | Caça | Exposição | Sem atividade |    |
| Cães  | 71                | 7    | 15        | 61            | 19 |
| Gatos | 16                | 0    | 0         | 39            | 47 |
| Total | 87                | 7    | 15        | 100           | 66 |

SD- sem dados

Variáveis como o número de abortos, número de partos e o contacto com outros animais, foram incluídas na análise por serem consideradas fatores importantes neste estudo, visto poderem propiciar a bacteriemia da coxielose e a taxa de infeção. Além destas variáveis, tentou-se, também, aferir o número de nados mortos ou a sua existência mas as respostas foram vagas, não permitindo a sua inclusão na análise.

Relativamente à variável aborto, a resposta mais frequente por parte dos proprietários foi a sua ausência (N=181; 65,8%), embora tenham sido registadas até duas ocorrências no grupo em estudo, apresentando uma média de 0,14 abortos (DP=0,388). De referir que, em 68 animais, não foi possível obter esta informação (tabela 10). O número de partos oscilou entre zero (N=106; 38,5%) e sete (N=1; 0,4%), com uma média de 1,21 (DP=1,545). As respostas mais frequentes foram ausência de partos (N=106; 38,5%), um (N=29; 10,5%) e dois partos (N=30; 10,9%), apesar de existirem 66 animais sobre os quais não foi possível averiguar esta

informação, dado pertencerem a instituições ou abrigos e o seu historial ser desconhecido (tabela 10).

**Tabela 10:** Número de partos e abortos registados nos animais em estudo;

|              | Nº partos |       |            | Nº abortos |       |            |
|--------------|-----------|-------|------------|------------|-------|------------|
|              | Cães      | Gatos | Total (%)  | Cães       | Gatos | Total (%)  |
| <b>SD</b>    | 24        | 42    | 66 (24)    | 25         | 43    | 68 (24,7)  |
| <b>0</b>     | 65        | 41    | 106 (38,5) | 127        | 54    | 181 (65,8) |
| <b>1</b>     | 24        | 5     | 29 (10,5)  | 18         | 5     | 23 (8,4)   |
| <b>2</b>     | 22        | 8     | 30 (10,9)  | 3          | -     | 3 (1,1)    |
| <b>3</b>     | 19        | 5     | 24 (8,7)   | -          | -     | -          |
| <b>4</b>     | 11        | 1     | 12 (4,4)   | -          | -     | -          |
| <b>5</b>     | 5         | -     | 5 (1,8)    | -          | -     | -          |
| <b>6</b>     | 2         | -     | 2 (0,7)    | -          | -     | -          |
| <b>7</b>     | 1         | -     | 1 (0,4)    | -          | -     | -          |
| <b>Total</b> | 173       | 102   | 275        | 173        | 102   | 275        |

SD- Sem dados

No que diz respeito à co-habitação, as respostas mais frequentes indicaram o contacto dos animais em estudo só com gatos (N=72; 26,2%), só com cães (N=54; 19,6%), com cães, gatos, equídeos e aves (N=43; 15,6%) ou, mesmo, a ausência de contacto com outros animais (N=43; 15,6%). Respostas menos frequentes incluíram o contacto com hamsters (N=1; 0,4%), cães, aves e répteis (N=1; 0,4%) ou ruminantes e aves (N=1; 0,4%). De referir que, em nove animais, não foi possível avaliar esta variável por ausência de informação (Tabela 11).

**Tabela 11:** Número de cães e gatos em contacto com outros animais.

|                                                  | Nº de animais |      |           |
|--------------------------------------------------|---------------|------|-----------|
|                                                  | Gatos         | Cães | Total (%) |
| Cães                                             | 2             | 52   | 54 (19,6) |
| Cães e aves                                      | 0             | 2    | 2 (0,7)   |
| Cães e equídeos                                  | 0             | 2    | 2 (0,7)   |
| Cães e gatos                                     | 10            | 25   | 35 (12,7) |
| Cães e ruminantes                                | 0             | 4    | 4 (1,5)   |
| Cães, aves e répteis                             | 0             | 1    | 1 (0,4)   |
| Cães, equídeos, ruminantes e gatos               | 0             | 2    | 2 (0,7)   |
| Cães, gatos e equídeos                           | 2             | 0    | 2 (0,7)   |
| Cães, gatos, aves, suínos, equídeos e ruminantes | 0             | 4    | 4 (1,5)   |
| Cães, gatos, equídeos e aves                     | 0             | 43   | 43 (15,6) |
| Gatos                                            | 71            | 1    | 72 (26,2) |
| Roedores                                         | 0             | 1    | 1 (0,4)   |
| Ruminantes, aves                                 | 0             | 1    | 1 (0,4)   |
| Sem contacto com outros animais                  | 13            | 30   | 43 (15,6) |
| Sem dados                                        | 4             | 5    | 9 (3,3)   |
| Total                                            | 102           | 173  | 275       |

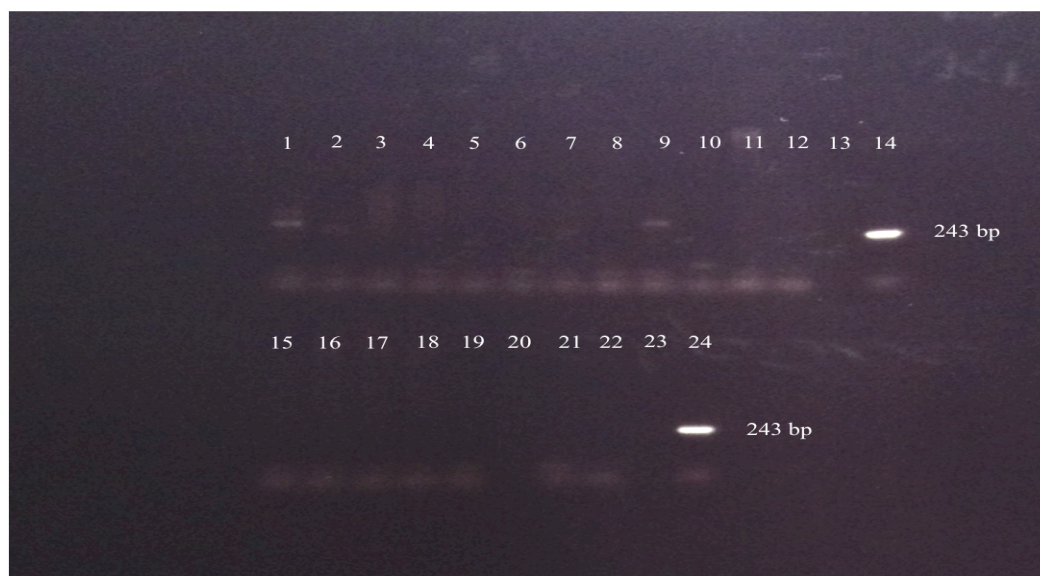
Para categorizar as espécies com as outras variáveis demográficas procedeu-se ao cruzamento de variáveis. Assim, relativamente aos gatos (N=102) o número de partos distribuiu-se entre zero (N= 41; 68,3%) e quatro (N=1; 1,7%), na maioria dos casos sem abortos registados (N=54; 91,5%) ou com um número máximo não superior a um (N=5; 8,5%) (Tabela 10). Neste grupo, o contacto mais frequente foi com animais da mesma espécie, exclusivamente (N=71; 72,4%) ou em conjunto com cães (N=10; 10,2%) (tabela 11). Quanto aos 173 cães em análise, o número de partos variou entre zero (N=65; 43,6%) e sete (N=1; 0,4%), não havendo, na maioria dos casos, registo de abortos (N=127; 85,8%); apenas foi referida a ocorrência de um aborto em 18 cães (12,2%) e de dois abortos em três (2,0%) (tabela 10). Este foi o grupo que apresentou maior variabilidade na co-habitação com outros

animais embora, à semelhança dos gatos, o contacto mais frequente tenha ocorrido com a mesma espécie (tabela 11).

### 3. Pesquisa de ADN de *Coxiella burnetii*

Como referido anteriormente, a extração de ADN foi realizada por processo manual para as zaragatoas e automático, com recurso a kits comerciais, para os restantes tipos de amostras. A concentração de ADN foi calculada por espetofotometria e variou entre 96,50 e 3439,80 ng/μL com um valor médio de 1768,15 ng/μL (DP= 566,283) para os úteros. Para as placentas obtiveram-se valores entre 10,40 e 2020,40 ng/μL, com uma média de 632,95 ng/μL (DP= 526,605) para placentas. No sangue, este valor variou entre 10,00 e 417,80 ng/μL, tendo sido obtida uma média de 179,12 ng/μL (DP= 94,063). No caso das zaragatoas a concentração de ADN teve um valor médio de 24,62 ng/μL (DP= 22,988) com o valor mínimo de 6,50 ng/μL e máximo de 121,80 ng/μL.

Para efetuar a pesquisa de ADN de *C. burnetii* utilizou-se o método de PCR *nested*. Todas amostras que apresentaram como resultado da amplificação fragmentos de ADN de dimensão idêntica à do controlo positivo (243 pb) foram consideradas suspeitas e preparadas para sequenciação (figura 3).



**Figura 3:** Resultado da eletroforese em gel de agarose da pesquisa de ADN de *C. burnetii* por PCR. Linhas 1 a 12; 15 a 19 - amostras em estudo; Linhas 21 e 22 – controlos negativos da reação; Linhas 14 e 24 – controlo positivo com ADN *C. burnetii* Nine Mile; 1 e 9 – amostras com fragmentos de ADN suspeitos enviados para confirmação da identidade por sequenciação

Do total de 439 amostras, a sequenciação foi realizada em 36 mas em nenhuma amostra se confirmou a identidade dos fragmentos de ADN como *C. burnetii* tendo sido consideradas negativas (tabela 12).

**Tabela 12:** Número de suspeitos obtidos na pesquisa de ADN de *C. burnetii* nas amostras em estudo

| Número de suspeitos/ total de amostra |                   |          |        |        |           |        |
|---------------------------------------|-------------------|----------|--------|--------|-----------|--------|
|                                       | Amostras atípicas | Placenta | Sangue | Útero  | Zaragatoa | Total  |
| Cães                                  | -/4               | 2/12     | 4/78   | 8/82   | 12/65     | 26/241 |
| Gatos                                 | -/0               | -/12     | 4/89   | 6/94   | -/3       | 10/198 |
| Total                                 | -/4               | 2/24     | 8/167  | 14/176 | 12/68     | 36/439 |

#### 4. Pesquisa de anticorpos anti-*Coxiella burnetii* em fase I e fase II

De 149 amostras de sangue (69 cães e 80 de gatos) foi separado plasma para detecção de anticorpos anti-*C. burnetii* em fase I e fase II. A técnica utilizada foi a imunofluorescência indireta (IFA) tendo sido adotado um *cut-off* (ou limiar de positividade) de 50.

De entre as amostras analisadas, nove (3,3%) apresentaram títulos de IFA positivos, ou seja, iguais ou superiores a 50 (tabela 13). As amostras positivas corresponderam a três (4,3%) dos 69 cães e seis (7,5%) dos 80 gatos. Com a titulação destas amostras foi possível verificar que os títulos de fase I variaram entre <50 e 800 e de fase II entre <50 e 400, sendo mais frequente resultados positivos em fase II do que em fase I (tabela 13). Todos os animais apresentaram idades iguais ou inferiores a 3 anos e eram, maioritariamente, provenientes de Lisboa (77,8%), tinham contacto com outros animais e acesso ao exterior (66,7%), embora não tenha sido encontrado significado estatístico nas diferenças observadas. Por exemplo, relativamente à variável espécie o teste Qui-Quadrado obteve um valor não significativo  $\chi^2$  (1) = ,649;  $p=0,421$ , não sendo possível aferir em que espécie o contacto com a bactéria é mais prevalente.