

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ)**

**Doutorado em Medicina Tropical**

**Febre Q: pacientes suspeitos de dengue, animais domésticos, animais silvestres e  
artrópodes no Estado do Rio de Janeiro.**

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

**RIO DE JANEIRO**

**2015**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ)**

**Doutorado em Medicina Tropical**

**Febre Q: pacientes suspeitos de dengue, animais domésticos, animais silvestres e artrópodes no Estado do Rio de Janeiro.**

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

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

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

**RIO DE JANEIRO**

**2015**

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

M325 Mares-Guia, Maria Angélica Monteiro de Mello

Febre Q: pacientes suspeitos de dengue, animais domésticos, animais silvestres e artrópodes no Estado do Rio de Janeiro / Maria Angélica Monteiro de Mello Mares-Guia. – Rio de Janeiro, 2015.  
xiv,166 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2015.  
Bibliografia: f. 70-79

1. *Coxiella burnetii*. 2. Febre Q. 3. Análise molecular. 4. Análise sorológica. 5. Vigilância epidemiológica. I. Título.

CDD 616.91852

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ)**

**Doutorado em Medicina Tropical**

**Febre Q: pacientes suspeitos de dengue, animais domésticos, animais silvestres e  
artrópodes no Estado do Rio de Janeiro.**

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

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

Aprovada em: 18 de dezembro de 2015

**EXAMINADORES:**

Dr.– Márcio Neves Bóia/FIOCRUZ

Dr.– Marco Aurélio Pereira Horta/FIOCRUZ

Dr.– Carlos Luiz Massard/UFRJ

Dra.– Daniela Tupy de Godoy/FIOCRUZ

Dr.– Ivano de Pilippis/FIOCRUZ

Dra.– (Suplente) – Martha Cecilia Suárez Mutis/FIOCRUZ

Dra.– (Suplente) – Ana Bispo/FIOCRUZ

**RIO DE JANEIRO**

**2015**

*O medíocre discute pessoas.*

*O comum discute fatos.*

*O sábio discute ideias.*

*Provérbio Chinês*

*Por causa do ferreiro, perdeu-se o prego;  
por causa do prego, perdeu-se a ferradura;  
por causa da ferradura, perdeu-se o cavalo;  
por causa do cavalo, perdeu-se o mensageiro;  
por causa do mensageiro, perdeu-se a carta;  
por causa da carta, perdeu-se a guerra.*

*Provérbio Chinês*

*Uma pessoa inteligente resolve um problema, um sábio o previne.*

*Albert Einstein*

## AGRADECIMENTOS

Aos homens da minha vida, meu marido e meu filho Pedro, seu cuidado a cada respiração minha, sempre prontos para não me deixar esmorecer e tornaram este dia e este trabalho possível. Ser amada por vocês me torna uma pessoa melhor.

Aos enteados e meus netos pela paciência durante este tempo.

Ao meu pai e prof. Rubens e minha amada luz Catarina, que não só se satisfizeram de me apoiar com todo carinho e cuidado durante este processo, como foram além, indo ao trabalho de campo comigo e me proporcionando uma das melhores situações da vida. Obrigada e nem tenho palavras para descrever.

À minha mãe com seu amor infinito e meus irmãos pelo amor e companheirismo, sempre juntos.

À minha orientadora, Dra. Elba Regina Sampaio de Lemos, que com seu exemplo sempre de retidão e dedicação me ensinou a ser honrada. Na verdade não conheço nenhum orientador que viva realmente a cada descoberta e vá ao campo trabalhar e apoiar seu aluno. Obrigada por me orientar nesta tese de doutorado em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz e por trilhar este caminho da febre Q.

Aos colegas e amigos, profissionais do Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses, o meu carinho por estarem ao meu lado. Mesmo com o apoio de todos, sempre existem aquelas pessoas especiais do qual seu trabalho não seria possível, a minha amiga Tatiana, minha filhota Endiá, a querida Michelle, a Mariana, ao companheiro Jairo, meu querido Alexandro e Jorlan, meu agradecimento eterno.

Aos profissionais da plataforma NB3, pela disponibilidade para procedimentos técnicos e em especial à Marília sempre com uma agradável cooperação.

À Secretaria Municipal de Saúde de Itaboraí, em especial ao coordenador Sandro que participou das visitas domiciliares e sempre apoiou meu projeto no município.

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

Aos pacientes e seus familiares pela disponibilidade e dedicação na colaboração para realização deste trabalho.

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

## SUMÁRIO

Pág.

LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES E SÍMBOLOS

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Considerações Gerais.....	1
1.2. Etiologia.....	2
1.2.1.Caracterização do Agente Etiológico.....	2
1.2.2.Variações Antigênicas e Ciclo de Vida Intracelular .....	3
1.2.3.Ciclo de vida e manutenção na natureza .....	4
1.3.Patogenia.....	5
1.4.Modos de transmissão .....	6
1.5.Estudos Soro-epidemiológicos .....	7
1.6.Situação no Brasil .....	8
1.7.Infecção em Humanos – febre Q .....	10
1.7.1.Febre Q Aguda .....	11
1.7.2.Febre Q Crônica .....	12
1.8.Infecção em Animais – coxielose .....	12
1.9. <i>Coxiella Burnetii</i> em artrópodes .....	13
1.9.1 <i>Coxiella</i> , endossimbiontes e carrapatos.....	14
1.10. Diagnóstico Laboratorial .....	15
1.10.1.Diagnóstico Sorológico.....	15
1.10.2.Diagnóstico Molecular .....	16
1.10.3.Isolamento Bacteriano.....	17
1.10.4.Histopatologia Associada com Imunohistoquímica.....	18
1.11.Tratamento e medidas de prevenção.....	18
1.11.1.Tratamento e monitoramento de pacientes com febre Q .....	18
1.11.2.Tratamento de animais .....	19
1.11.3.Profilaxia e Medidas de Prevenção .....	20
2. JUSTIFICATIVA .....	22
3. OBJETIVOS .....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1.Considerações Éticas .....	26

4.2. Local do Estudo .....	26
4.3. Desenho do Estudo .....	27
4.4. Estudo em Humanos .....	29
4.4.1. Casos Suspeitos de Dengue.....	29
4.4.2 Testes Utilizados para Dengue e Febre Q.....	30
4.5. Estudo seccional com coleta de amostra de sangue de familiares, de animais domésticos e de artrópodes nas áreas de ocorrência de casos de febre Q .....	30
4.6. População de Animais Domésticos.....	31
4.7. População de Animais Silvestres .....	31
4.8. Análise Laboratorial .....	32
4.8.1. Teste sorológico .....	32
4.8.2. Análise molecular.....	33
4.8.2.1. Procedimento de implantação de PCR <i>Nested</i> .....	34
4.8.2.2. Procedimento de avaliação de especificidade da <i>Nested</i> PCR.....	36
4.8.2.3. Protocolo de análise molecular utilizando como alvo o <i>com1</i> (gene que codifica uma proteína da membrana externa de 27 kDa da <i>C. burnetii</i> ) .....	36
4.8.2.4. Procedimento de sequenciamento e análise filogenética .....	37
4.8.2.5. Análise dos artrópodes .....	37
5. RESULTADOS .....	39
5.1. Procedimento de Implantação de <i>Nested</i> PCR .....	39
5.1.1. Sensibilidade da PCR e <i>Nested</i> PCR.....	39
5.1.2. Especificidade dos ensaios da PCR e <i>Nested</i> PCR .....	41
5.2. Casos de Febre Q e o Diagnóstico Diferencial com Dengue.....	41
5.2.1. Pacientes suspeitos de dengue atendidos no Hospital Municipal Desembargador Leal Junior em Itaboraí.....	41
5.2.2. Casos de Febre Q e Prevalência de anticorpos anti- <i>Coxiella burnetii</i> .....	43
5.3. Estudo seccional com coleta de amostra de sangue de familiares, de animais domésticos e de artrópodes nas áreas de ocorrência de casos de febre Q .....	45
5.4. População de Animais Domésticos.....	53
5.5. População de Animais Silvestres .....	56
5.6. Atividades Realizadas em Resposta aos Resultados Obtidos .....	56
5.6.1. Tratamento e Medidas de Prevenção.....	56
5.6.2. Materiais de apoio tanto epidemiológico como de informação epidemiológica.....	57



6. DISCUSSÃO .....	58
6.1. FEBRE Q E O DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL COM DENGUE.....	58
6.2. ESTUDO NAS ÁREAS DE OCORRÊNCIA DE CASOS DE FEBRE Q .....	61
6.3. POPULAÇÃO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS .....	63
6.4. POPULAÇÃO DE ANIMAIS SILVESTRES.....	64
6.5. A IMPLANTAÇÃO DA <i>NESTED</i> PCR .....	65
6.6. ATIVIDADES REALIZADAS EM RESPOSTA AOS RESULTADOS OBTIDOS .....	66
7. CONCLUSÕES .....	67
8. PERSPECTIVAS .....	69
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70
10. ARTIGOS RELACIONADOS AO CONTEÚDO DA TESE .....	80
ARTIGO 10.1: Molecular identification of Q fever in Patients with a Suspected Diagnosis of Dengue in Brazil in 2013-2014 .....	81
ARTIGO 10.2: Molecular identification of the agent of Q fever – <i>Coxiella burnetii</i> – in domestic animals in State of Rio de Janeiro, Brazil. ....	87
ARTIGO 10.3: Febre Q: uma zoonose esquecida. ....	92
ARTIGO 10.4: Clinical and epidemiological use of <i>Nested</i> PCR targeting the repetitive element <i>IS1111</i> associated with the transposase gene from <i>Coxiella burnetii</i> . ....	98
11. ATIVIDADES ACADÊMICAS E OUTRAS PUBLICAÇÕES.....	112
11.1. OUTRAS PUBLICAÇÕES .....	112
11.2. RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS.....	160
11.3. APRESENTAÇÃO ORAL EM CONGRESSO .....	160
11.4. OUTRAS ATIVIDADES ACADÊMICAS.....	160
11.5. MENÇÃO HONROSA.....	160
11.6. COAUTORIA EM CAPÍTULO DE LIVRO.....	160
11.7. CO-ORIENTAÇÃO DE MONOGRAFIA .....	161
12. ANEXOS	
Anexo 1 .....	162
Anexo 2 .....	163
Anexo 3 .....	164
Anexo 4 .....	166

## LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES E SÍMBOLOS

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

## LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

### FIGURAS

Pág.

Figura 1.1. Distribuição da febre Q humana, com bases em revisões bibliográficas e relatos de casos.....	1
Figura 1.2. Figura esquemática ilustrando a inter-relação entre os ciclos da perpetuação da infecção na natureza entre animais domésticos e animais silvestres .....	5
Figura 4.1. Mapa do Município de Itaboraí.....	27
Figura 4.2. Mapa do Município de Itaboraí e áreas de coleta de animais silvestres, para pesquisa de infecção por <i>Coxiella burnetii</i> , com situações eco-epidemiológicas e graus de conservação distintos.....	28
Figura 4.3. Sumário esquemático da metodologia utilizada na pesquisa de febre Q no município de Itaboraí/RJ durante o período de 2011 a 2015. As etapas com a população de estudo relacionadas à pesquisa se encontram no quadro retangular.....	29
Figura 4.4 Figura esquemática da lâmina para teste de imunofluorescência indireta para febre Q com dois microcículos dentro do poço contendo antígenos da fase II (microcículo do lado esquerdo) e da fase I (microcículo do lado direito) Teste comercial PANBIO/MEDVAX®. ....	33
Figura 5.1. Ensaio de PCR com <i>Coxiella burnetii</i> realizadas com <i>primers</i> de trans-PCR como descrito em Materiais e Métodos. ....	39
Figura 5.2. Ensaio de PCR com gradientes de <i>Coxiella burnetii</i> nas temperaturas de anelamento.....	40
Figura 5.3. Ensaio de PCR com <i>Coxiella burnetii</i> realizadas com <i>primers</i> de <i>Nested</i> como descrito no item 4.....	41
Figura 5.4: Mapa demonstrando a localização dos casos de febre Q identificados em 2013 no município de Itaboraí e nos municípios limítrofes, assim como as distâncias entre os pontos mais próximos e os mais distantes do caso index confirmado em 2008.....	45
Figura 5.5: Características dos ambientes onde foram feitas as coletas de artrópodes no município de Itaboraí para pesquisa de infecção por <i>Coxiella burnetii</i> , em 2015, A numeração das fotos corresponde às áreas, além de áreas em seu entorno, onde casos de febre Q foram confirmados.....	47

Figura 5.6: Mapa de georreferenciamento das áreas de coletas de artrópodes no município de Itaboraí/RJ, onde casos de febre Q foram confirmados durante o período de vigilância de febre Q nos casos suspeitos de dengue atendidos no Hospital Municipal Desembargador Leal Júnior no período de 2013 e 2014 e as áreas do entorno.....	48
Figura 5.7: Gel de eletroforese de resultado de <i>Nested</i> de gene que codifica uma proteína da membrana externa de 27 kDa da <i>C. burnetii com1</i> para DNA de artrópodes positivos.....	54
Figura 5.8. Coleta de amostras de ovelha e gato positivos na propriedade de ocorrência do caso índice de febre Q.....	55

## QUADROS E TABELAS

Quadro 1.1. Principais Estudos de Soroprevalência de Anticorpos anti- <i>C. burnetii</i> em Diferentes Populações (1999 a 2015). .....	7
Quadro 1.2. Publicações baseadas em sorologia relativas à febre Q no Brasil.....	9
Quadro 1.3. Manifestações clínicas e complicações agudas em pacientes sintomáticos de febre Q aguda e achados laboratoriais mais frequentes em pacientes com febre Q aguda.....	11
Quadro 1.4. Orientações para o tratamento da febre Q (Angelakis & Raoult, 2010).....	19
Quadro 1.5. Inativação de <i>C. burnetii</i> em relação a vários agentes físico-químicos (Scott & Williams, 1990; Madariaga et al., 2003). .....	21
Quadro 4.1. Oligonucleotídeos ( <i>primers</i> ) utilizados para detecção de <i>Coxiella burnetii</i> nas amostras humanas, de animais vertebrados e ectoparasitas, município de Itaboraí/RJ.....	34
Quadro 4.2. Oligonucleotídeos ( <i>primers</i> internos) utilizados para detecção de <i>Coxiella burnetii</i> na segunda reação de PCR. Laboratório de hantavirose e Ricettsioses, IOC, FIOCRUZ. ....	35
Quadro 4.3. Oligonucleotídeos ( <i>primers</i> ) utilizados para detecção de <i>Coxiella burnetii</i> na reação de PCR com alvo <i>com1</i> .....	36
Tabela 5.1. Distribuição e comparação dos dados clínicos e epidemiológicos entre 156 pacientes dengue-positivos e 102 dengue negativos diagnosticados no município de Itaboraí, Rio de Janeiro (2013-2014).....	42

Tabela 5.2. Resultados sorológicos através de imunofluorescência indireta (IFI) e moleculares das amostras de soro e coágulo dos pacientes atendidos no Hospital Municipal Desembargador Leal Junior de 2013-2014.....	43
Tabela 5.3: Distribuição das idades e manifestações clínicas de nove pacientes com diagnóstico de febre Q - confirmados pela PCR, em Itaboraí e em áreas do entorno, Rio de Janeiro, Brasil (2013-2014). .....	44
Tabela 5.4: Distâncias em quilômetros entre as áreas onde foram realizadas as coletas de artrópodes, no município de Itaboraí/RJ no período de 2015. A numeração corresponde às áreas com casos de febre Q e as letras, significam a inclusão de áreas do entorno. ....	46
Tabela 5.5: Coleta de artrópodes feita em 2015 em áreas onde foram encontrados pacientes positivos e nas áreas próximas no entorno.....	49
Tabela 5.6: Resultados sorológicos obtidos pelo teste de imunofluorescência indireta (IFI) e moleculares (PCR) em amostras de sangue de contactantes dos casos de febre Q no município de Itaboraí, maio de 2015.....	50
Tabela 5.7. Resultados sorológicos obtidos pelo teste de imunofluorescência indireta (IFI) e moleculares (PCR) em amostras de sangue de animais nas propriedades de ocorrência de casos de febre Q no município de Itaboraí, março de 2015.....	51
Tabela 5.8: Resultados sorológicos obtidos pelo teste de imunofluorescência indireta (IFI) e moleculares (PCR) em amostras de sangue de casos de febre Q e de contactantes no município de Itaboraí, agosto de 2015 .....	51
Tabela 5.9: Resultados sorológicos obtidos pelo teste de imunofluorescência indireta (IFI) e moleculares (PCR) em amostras de sangue de animais das propriedades de ocorrência de casos de febre Q no município de Itaboraí, em agosto e setembro de 2015.....	52
Tabela 5.10: Amostras PCR positivas para <i>Coxiella burnetii</i> e sequenciadas com os respectivos números de acesso ao GenBank, procedentes de animais e dos respectivos artrópodes do município de Itaboraí/RJ .....	53
Tabela 5.11. Resultados obtidos pelos testes de imunofluorescência indireta (IFI) e moleculares (PCR) dos animais domésticos, na área do caso index de febre Q, no município de Itaboraí/RJ, em 2011 e 2012.....	54
Tabela 5.12. Pequenos mamíferos capturados no Município de Itaboraí, Rio de Janeiro, em três expedições realizadas entre outubro de 2011 a setembro de 2012.....	56

## RESUMO

Febre Q é uma zoonose cosmopolita causada por *Coxiella burnetii*, uma bactéria intracelular obrigatória gram-negativa da ordem Legionellales. A doença, que ocorre como pequenos surtos ou casos isolados, tem amplo espectro clínico, desde doença febril limitada, pneumonia, hepatite à endocardite e meningoencefalite. Pequenos roedores silvestres são importantes reservatórios, mas a infecção humana está principalmente relacionada a ovelhas, cabras e gado bovino, embora gatos, cães e coelhos estejam implicados em surtos urbanos. Na população humana a transmissão ocorre por aerossóis provenientes de líquido amniótico, placenta e lã, além da urina, fezes, leite e outras secreções animais contendo o agente. No Brasil, a primeira descrição de febre Q ocorreu em 1953. Embora casos esporádicos confirmados por teste sorológico e estudos sorológicos tenham apontado para a presença de *C. burnetii* no Brasil, somente em 2008 o agente foi identificado por análise molecular em paciente no município de Itaboraí/RJ. Com a consequente caracterização da infecção também nos animais domésticos de propriedade do paciente, durante o período de 2010-2011, o presente estudo foi proposto com o objetivo de: (i) realizar a vigilância de febre Q em pacientes com suspeita de dengue internados no Hospital Municipal Desembargador Leal Júnior, em Itaboraí, durante o período de 24 meses; (ii) verificar a presença de infecção nos familiares dos casos de febre Q; (iii) analisar os animais de propriedade dos casos de febre Q; (iv) investigar a presença de *C. burnetii* em animais silvestres capturados nas áreas de onde procederam os casos de febre Q e (v) pesquisar *C. burnetii* nos artrópodes coletados nos animais. Neste estudo foram utilizados o teste de imunofluorescência indireta e a análise molecular (PCR) visando os elementos IS1111 transposase no genoma de *C. burnetii*. Dos 272 pacientes atendidos no período de 2013 a 2014, 26 (10%) apresentaram anticorpos anti-*C. burnetii* e nove (3,3%) foram PCR positivos. Um dos pacientes apresentou também infecção por dengue. A análise das sequências genômicas obtidas demonstrou a elevada similaridade entre si (99-100%) e com as sequências de *C. burnetii* depositadas no GenBank. Dos 35 animais domésticos estudados, seis foram sororreativos: 1/13 cães, 3/13 gatos, 2/9 ovelhas. A análise molecular foi positiva em swab anal de um filhote de gato e em amostra de tecido do úbere da ovelha sororreativa com história de aborto. Todos os 59 animais silvestres dos gêneros *Didelphis*, *Philander*, *Micoureus*, *Akodon*, *Oligoryzomys* e *Nectomys* foram negativos na análise molecular. Dos 283 artrópodes analisados, DNA de *C. burnetii* foi amplificado em oito dos 266 exemplares de *Rhipicephalus sanguineus* e em um exemplar de oito *Amblyomma sculptum* e nenhum dos sete *Dermacentor nitens* e duas pulgas *Ctenocephalides canis* identificados. Os resultados comprovam a presença de *C. burnetii* em Itaboraí, confirmam a necessidade da inclusão da febre Q no diagnóstico diferencial da dengue e alertam para a necessidade da sensibilização dos profissionais de saúde sobre a ocorrência desta zoonose no Brasil.

## ABSTRACT

Q fever is a worldwide zoonosis disease caused by *Coxiella burnetii*, a gram-negative obligate intracellular bacterium of the legionellales order. The disease, which occurs as individual cases or small outbreaks have broad-spectrum clinical manifestation from limited febrile disease, pneumonia, endocarditis, hepatitis and meningoencephalitis. Small wild rodents are important reservoirs, but human infection is mainly related to sheep, goats and cattle, although cats, dogs and rabbits are involved in urban outbreaks. In human population, transmission occurs by aerosol from amniotic fluid, placenta and wool, as well as urine, feces, milk and other animal secretions, containing the agent. In Brazil, the first Q fever description occurred in 1953. Although sporadic cases confirmed by serological testing and sero-epidemiological studies have pointed to the presence of *C. burnetii* in Brazil, only in 2008 it was possible identify the agent in a patient's municipality of Itaboraí/RJ by molecular assay. With the consequent characterization of the infection also in domestic animals owned by the patient during the period 2010-2011, this study was proposed with the aim of: (i) conduct surveillance of Q fever in hospitalized patients with suspected dengue in Itaboraí at the Hospital Municipal Desembargador Leal Junior, during the period of 24 months; (ii) to verify the presence of Q fever infection in family cases ; (iii) analyzing, animals the property Q fever cases; (iv) investigate the presence of *C. burnetii* in wild animals captured in areas from which proceeded cases of Q fever and (v) search *C. burnetii* in arthropods collected from animals. This study used the indirect immunofluorescence assay and molecular analysis (PCR) targeting the IS1111 transposase elements in the genome of *C. burnetii*. Of the 272 patients assisted from 2013 to 2014, 26 (10%) had anti-*C. burnetii* antibodies, and nine (3.3%) were PCR positive. One of these patients had also dengue infection. The analysis of the genomic sequences obtained showed high similarity to each other (99-100%) and the sequences of *C. burnetii* in GenBank. Of the 35 domestic animals studied, six were seroreactive: 1/13 dogs, cats 3/13, 2/9 sheep. Molecular analysis was positive in anal swab of a young kitten and tissue sample from the udder of sororreativa sheep with abortion history. All 59 wild animals *Didelphis*, *Philander*, *Micoureus*, *Akodon*, *Oligoryzomys* and *Nectomys* were negative by molecular analysis. Of the 283 arthropods analyzed, *C. burnetii* DNA was amplified in eight of 266 *Rhipicephalus sanguineus* and a specimen of 8 *Amblyomma sculptum* and none of 7 *Dermacentor nitens* and 2 fleas *Ctenocephalides canis* identified. The results show the presence of *C. burnetii* in Itaboraí, confirm the need for inclusion of Q fever in dengue differential diagnosis and point to the need of awareness among health professionals about the occurrence of this zoonosis in Brazil.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações Gerais

Febre Q é uma zoonose cosmopolita causada por *Coxiella burnetii* (Derrick, 1939; Philip, 1948). Descrita pela primeira vez em trabalhadores de abatedouro em Queensland, Austrália, a febre Q, cujo nome faz referência ao termo “query” (febre query), é um importante problema de saúde pública na Europa, especialmente na Holanda e França, na Austrália e, mais recentemente, no continente norte americano com o crescente número de casos notificados nos últimos cinco anos e, onde em torno de 3% da população adulta geral é sororreativa (Georgiev et al, 2013; Anderson et al, 2009; Maurin & Raoult, 1999).

Com vários surtos epidêmicos e relatos de casos em diversas regiões do mundo, com exceção da Nova Zelândia, a infecção por *C. burnetii* tem sido predominante identificada como doença ocupacional, associada com ruminantes, embora mais recentemente venha sendo observado o aumento de casos em área urbana, cuja transmissão tem sido relacionada com animais de companhia como gatos e cães (Fournier et al, 1998).

Com base nos artigos de revisão disponíveis na literatura, considerando que na maioria dos países a febre Q não está incluída na lista das doenças de notificação compulsória, se constata o escasso conhecimento sobre esta zoonose em muitos países africanos e latino americanos (Figura 1.1) (Georgiev et al, 2013; Anderson et al, 2009; Maurin & Raoult, 1999).

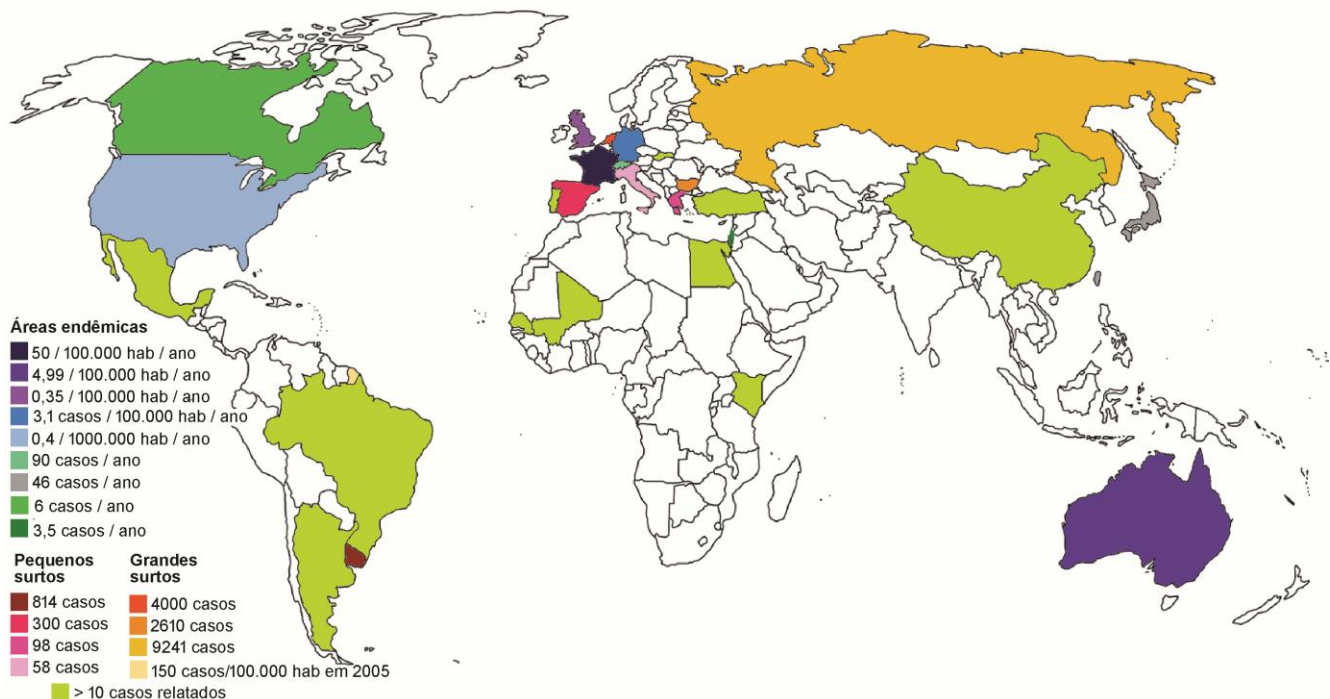


Figura 1.1. Distribuição da febre Q humana, com bases em revisões bibliográficas e relatos de casos.



Neste cenário, a epidemiologia da febre Q tem sido caracterizada, a partir de investigações de surtos definidos e de inquéritos sorológicos realizados na população humana ou em animais, predominantemente nos países do hemisfério norte e Austrália (Angelakis & Raoult, 2011; Maurin & Raoult, 1999).

## **1.2. Etiologia**

### **1.2.1 Caracterização do Agente Etiológico**

*Coxiella burnetii* é uma pequena bactéria intracelular obrigatória gram-negativa e pleomórfica (0,2 a 0,4 µm de largura, 0,4 a 1 µm de comprimento). Apesar de possuir uma membrana semelhante à de uma bactéria Gram-negativa, geralmente não é capaz de ser corada pela técnica de Gram. O método de Gimenez (Gimenez, 1964) é geralmente usado para corar *C. burnetii* em amostras clínicas ou culturas de laboratório. Uma vez que *C. burnetii* não pode ser cultivada em meio axênico e tem sido recuperada de carrapatos, foi inicialmente classificada na ordem Rickettsiales, na família Rickettsiaceae, e no grupo rickettsias juntamente com os gêneros *Rickettsia* e *Rochalimaea*. No entanto, análises filogenéticas, baseadas principalmente na sequência 16S rRNA, mostraram que o gênero *Coxiella* pertence à subdivisão gama de Proteobactéria, com os gêneros *Legionella*, *Francisella* e *Rickettsiella* (Raoult et al, 2005; Stein et al, 1993).

O genoma do primeiro isolado americano de *C. burnetii*, que foi identificado a partir de um carrapato e denominado cepa Nine Mile, apresenta 1.995.275 pb. A análise mostrou que o genoma de *C. burnetii* possui mais genes envolvidos em processos metabólicos do que outras bactérias intracelulares, tais como *Chlamydia*, *Rickettsia* e *Anaplasma*. *C. burnetii* tem um cromossoma circular e um plasmídeo facultativo. Quatro tipos de plasmídeo foram identificados, embora nem todas as cepas apresentem plasmídeos. Curiosamente, em estudo realizado em modelo murino, autores identificaram uma provável correlação entre a fase de lipopolissacarídeo (LPS) e o tipo de plasmídeo com as manifestações clínicas de febre aguda (Angelakis & Raoult, 2011).

Estas observações e comparações com os genomas de outras bactérias intracelulares obrigatórias sequenciadas sugerem que *C. burnetii* pode ter uma transição relativamente recente em seu ciclo de vida atual (Seshadri et al, 2003).

*Coxiella burnetii* é considerado um agente de classe de risco 3 e sendo classificada um agente classe B de ameaça bioterrorista pelos Centros dos EUA em atividades para Controle e Prevenção de Doenças e tem atraído muita atenção da comunidade científica desde 2009 (CDC, 2007). Esta γ-proteobactéria, embora não tenha elevada taxa de letalidade, se utilizada

como arma biológica em forma de aerossol tem a capacidade de se dispersar numa linha de 2 km e provocar doença incapacitante aguda (Madariaga et al, 2009).

### **1.2.2 Variações Antigênicas e Ciclo de Vida Intracelular**

*Coxiella burnetii* apresenta variações antigênicas semelhantes à variação lisa-rugosa da família Enterobacteriaceae. A variação de fase está relacionada principalmente à mutação no lipopolissacarídeo (LPS). A fase I, a fase natural encontrada nos animais infectados, artrópodes ou seres humanos, correspondente ao LPS de variação lisa, é altamente contagiosa, pois uma única bactéria é suficiente para infectar o homem (Angelakis & Raoult, 2011). LPS fase I, com sua estrutura de carboidratos estendida, bloqueia o acesso de anticorpos para proteínas de superfície, evento que explica, em parte, a persistência da bactéria em locais protegidos da resposta imune, após recuperação de casos agudos de febre Q, na presença da soropositividade ao longo da vida (Fournier et al, 1998).

Em contraste, a fase II, de menor infectividade e obtida somente em laboratórios, após passagens seriadas em culturas celulares ou em ovos embrionados, corresponde ao LPS da variação rugosa. A fase II, ao contrário da fase I, exibe um LPS truncado na qual se identifica a ausência de algumas proteínas determinantes da superfície celular (Angelakis & Raoult, 2011; Angelakis & Raoult, 2010).

Como microrganismo intracelular que utiliza receptores específicos eucarióticos como as integrinas para invadir células hospedeiras, *C. burnetii* fase II penetra nos macrófagos humanos, a partir do receptor CR3, enquanto que *C. burnetii* fase I infecciosa, ao contrário, bloqueia a entrada através do receptor CR3, além de se ligar a monócitos humanos pelo complexo de LRI (leucócitos resposta integrina,  $\alpha\beta3$ ) e IAP (integrina-associada proteína). Assim, curiosamente, enquanto *C. burnetii* de fase I apesar de ser mal internalizada pelos monócitos e macrófagos, sobrevive dentro dessas células, a bactéria na fase II é interiorizada com facilidade pelos monócitos e macrófagos, mas rapidamente eliminada pela via fagolisossomial (Maurin & Raoult, 1999).

A resposta sorológica em infecções agudas é principalmente contra a bactéria de fase II, enquanto na infecção crônica há resposta sorológica para a fase I e II. Antígenos de fase I são menos imunogênicos que antígenos de fase II (Madariaga et al, 2009).

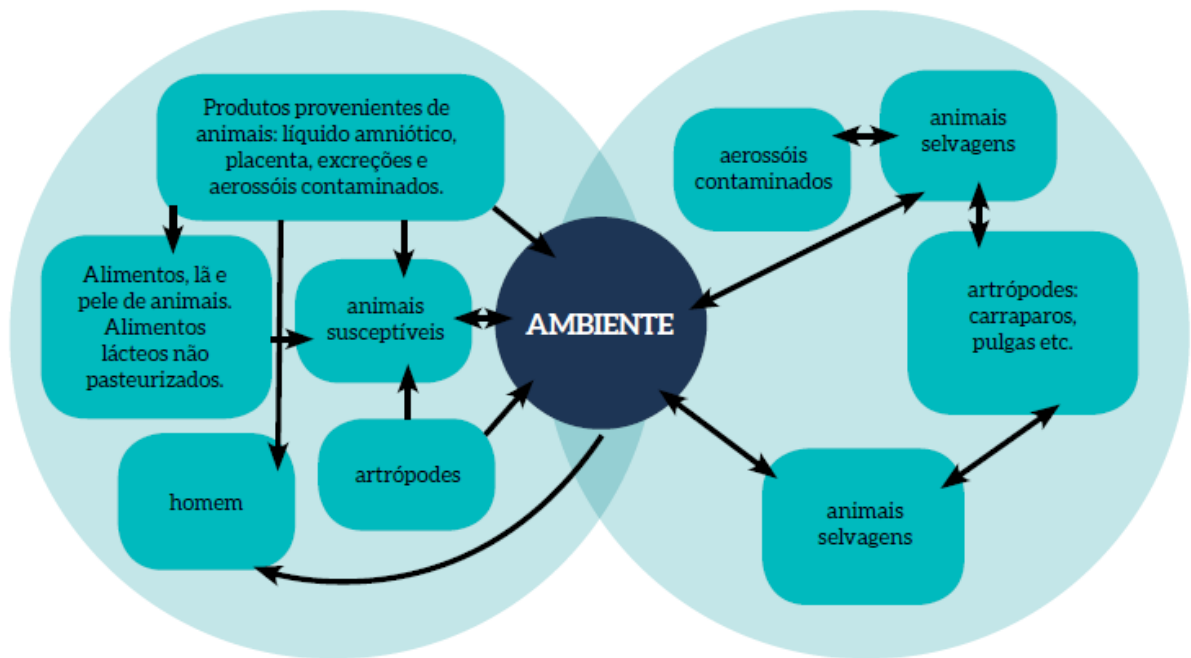
Como bactéria intracelular obrigatória que completa o seu ciclo de desenvolvimento no fagolisossomo, *C. burnetii* pode existir em duas formas morfológicas distintas: (i) a variante de grandes células (LCV), a forma metabolicamente ativa e menos eletro-densa que se desenvolve para persistir no fagolisossomo acidificado de monócitos ou macrófagos, (ii) a

variante de pequenas células (SCV) e ainda (iii) 'esporos-like' partículas, que podem persistir tanto no fagolisossoma quanto em condições ambientais extremas (Voth et al, 2009).

O ciclo de desenvolvimento de *C. burnetii* é composto por divisão binária transversal e esporulação. As formas de 'esporos-like' são resistentes ao calor e desinfecção e sobrevivem por um longo tempo no ambiente. Estas formas 'esporos-like', por não possuírem ácido dipicolínico e um revestimento rico em cisteína, são diferentes dos esporos clássicos encontrados em organismos Gram-positivos (Madariaga et al, 2009). A manutenção da infecção por *C. burnetii* depende da sua multiplicação no interior de um vacúolo ácido e da capacidade de evitar atividade microbicida nos macrófagos do hospedeiro. Em contraste com outras bactérias intracelulares, como *Legionella* ou *Mycobacterium*, a adaptação de *C. burnetii* para o ambiente intracelular é um pré-requisito para a sua sobrevivência e sua multiplicação (Baca & Paretsky, 1983). O meio ácido não somente permite a penetração de nutrientes necessários para o metabolismo de *C. burnetii* (Hackstadt & Williams, 1981) como também protege a bactéria do tratamento antimicrobiano, uma vez que a atividade dos antibióticos é alterada pelo pH ácido, fato que explica as recaídas de febre Q apesar do tratamento antibacteriano. Neste contexto, agentes lisossomotrópicos, como a cloroquina, que alcalinizam o fagolisossomo, combinados com doxiciclina, possibilitam estimular o “maquinário” microbicida dos macrófagos contra *C. burnetii* (Maurin et al, 1982).

### **1.2.3 Ciclo de vida e manutenção na natureza**

Na natureza têm sido identificados dois ciclos distintos que possibilitam a perpetuação da infecção por *C. burnetii*; o ciclo urbano/rural com a participação dos animais domésticos e um segundo, caracteristicamente silvestre, com a participação de animais como marsupiais, roedores, lagomorfos, entre outros, além de alguns ectoparasitas, principalmente, carrapatos. Embora não tenham importância na transmissão para o homem, carrapatos podem desempenhar um papel significativo na transmissão de *C. burnetii* entre os vertebrados. As relações entre os dois ciclos epidemiológicos se encontram esquematizadas na figura abaixo com base nas informações obtidas de fontes bibliográficas de diversos autores (Figura 1.2) (Maurin & Raoult, 1999; Fournier et al, 1998; Angelakis & Raoult, 2010), considerando que os carrapatos, são capazes de permanência no ambiente por longo período, atuam como elemento de ligação dos ciclos, entre animais silvestres e domésticos (Angelakis & Raoult, 2011). Assim, além dos ruminantes, animais de estimação, incluindo gatos, coelhos e cães, têm sido também identificados como potenciais fontes de surtos urbanos (Angelakis & Raoult, 2010).



Ciclo entre animais domésticos

Ciclo entre animais silvestres

Figura 1.2. Figura esquemática ilustrando a inter-relação entre os ciclos da perpetuação da infecção na natureza entre animais domésticos e animais silvestres (Maurin & Raoult, 1999; Fournier et al, 1998; Angelakis & Raoult, 2010).

### 1.3. Patogenia

A infecção por *C. burnetii* no homem pode variar de infecção assintomática até uma doença fatal e pacientes sintomáticos podem apresentar um amplo espectro clínico como pneumonia, hepatite, encefalite, ou miocardite, entre outras manifestações (Maurin & Raoult, 1999).

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

Com relação às variantes infectantes de *C. burnetii* e à imunopatogenicidade na febre Q, Izzo e Marmion (1993) sugerem que as bactérias de fase I, que se multiplicam no fagolisossoma de macrófagos, teriam uma vantagem de sobrevivência pela baixa regulação da produção de IFN- $\gamma$ , já que de outra forma, a célula hospedeira seria ativada com geração de metabólitos bactericidas. Evento inverso ocorre com *C. burnetii* na fase II, mais facilmente eliminadas pela sua incapacidade de restringir a resposta IFN- $\gamma$ , consequência, talvez, dos seus LPS truncados que se ligam a outros receptores de CD14 no macrófago (Maurin & Raoult, 1999).

A via de inoculação *C. burnetii* em humanos também pode determinar, em parte, a manifestação clínica predominante. A pneumonia é a forma mais frequente quando a fonte de transmissão ocorre através de aerossóis contaminados. A hepatite granulomatosa passa a ser a manifestação clínica predominante quando a transmissão ocorre através da ingestão de leite cru. No homem, a gravidade da febre Q aguda também tem sido associada em função da dose do inóculo infectante. Finalmente, fatores do hospedeiro, em especial o estado imunológico do paciente, decorrentes de um estado de imunodepressão, gravidez, da presença de valvopatia ou de prótese de válvula cardíaca podem influenciar o curso da infecção, incluindo a evolução para doença crônica (Maurin & Raoult, 1999, Angelakis & Raoult, 2010).

#### **1.4. Modo de transmissão**

A via de aerossol é o principal modo de transmissão de *C. burnetii* para o homem. A transmissão por aerossóis pode ocorrer diretamente a partir de fluidos provenientes do parto de animais infectados, contaminando animais recém-nascidos, placenta, ou lã. *Coxiella burnetii* é muito resistente à destruição na natureza, dispersando-se pelo vento e sobrevivendo durante várias semanas em áreas onde os animais estiveram presentes. Assim, a febre Q pode ocorrer em pacientes cuja história epidemiológica não se identifica qualquer contato evidente com os animais (Angelakis & Raoult, 2011).

Ingestão, em especial a ingestão de leite cru, é um fator menos provável na transmissão de *C. burnetii* e que, até a presente data, ainda é um ponto de controvérsia. Assim como a transmissão de pessoa para pessoa, que é um evento extremamente raro, casos esporádicos de febre Q humana têm sido identificados: i) após o contato com uma parturiente infectada (em um obstetra que realizou um aborto), ii) via de transmissão transplacentária resultando em infecções congênitas, iii) durante as necropsias, iv) através de inoculação intradérmica, ou v) através de transfusão de sangue (Maurin & Raoult, 1999).

Apesar de *C. burnetii* ter sido isolada de artrópodes, principalmente carrapatos, é improvável que a transmissão da febre Q por artrópodes em humanos seja significativa, embora cães possam ser infectados por picada de carrapato. Salienta-se que os vetores biológicos desempenham um papel significativo na transmissão de *C. burnetii* entre os vertebrados silvestres, em particular nos roedores, lagomorfos e aves selvagens (Angelakis & Raoult, 2010). A transmissão sexual de *C. burnetii* foi demonstrada experimentalmente em camundongos infectados, e alguns estudos revelam que este tipo de transmissão foi estabelecido também entre humanos (Miceli et al, 2010; Milazzo et al, 2001; Kruszewska et al, 1996).

## 1.5. Estudos Soro-epidemiológicos

O número de estudos soro-epidemiológicos tem crescido significativamente nos últimos 15 anos, predominantemente nos países do hemisfério norte, demonstrando, assim, a necessidade de mais pesquisas, principalmente no Brasil, país cuja circulação de *C. burnetii* tem sido confirmada desde a década de 1950. No quadro 1.1 é apresentada uma série dos principais estudos de soroprevalência realizados em diferentes regiões do mundo, devendo ser considerado, no entanto, que as prevalências estimadas foram baseadas em testes sorológicos e *cut-offs* diferentes, fatores que limitam a comparação dos resultados apresentados.

Quadro 1.1. Principais Estudos de Soroprevalência de Anticorpos anti-*C. burnetii* em Diferentes Populações (1999 a 2015).

País	População	Soroprevalência (%)	Referência
Australia	População geral	5,2; 7,0 ; 6,5	(Tozer et al, 2011; Islam et al, 2011; Parker et al, 2010)
Bosnia and Herzegovina	População saudável	35,2	(Hamzić et al, 2005)
Brasil	Pacientes positivos HIV	3,2	(Lamas et al, 2009)
Bulgaria	Doadores de sangue	38,0	(Serbezov et al.,1999)
Canada	Pastores	28,4	(Dolcé et al, 2003)
China	Fazendeiros	6,4	(Zhang et al, 2008)
Croacia	Pacientes febris	27,5	(Vilibic-Cavlek et al, 2012)
Dinamarca	Trabalhadores expostos a animais	11,0	(Bosnjak et al, 2010)
Inglaterra	Mulheres grávidas	4,6	(Baud et al, 2009)
Egito	Pessoas saudáveis expostas a animais	5,0	(Mazyad & Hafez, 2007)
França	Centro educacional agrícola Mulheres grávidas Mulheres grávidas /Grupo de risco/em área de surto	14,7 0,15 2,6; 5,5; 14,7	(King et al, 2011) (Rey et al, 2000) (Tissot-Dupont et al, 2007)
Alemanha	Veterinarios Os agricultores cujos animais tiveram abortos	38,0 22,0	(Bernard et al, 2012) (Georgiev et al, 2013)
Grecia	População geral	7,5	(Pape et al., 2009)
Italia	Trabalhadores expostos a animais Guardas florestais	73,4 2,8	(Monno et al, 2009) (Cinco et al, 2006)
Japão	Veterinarios, trabalhadores da área médica, Doadores de sangue	13,5 ; 5,1 ; 3,6	(Abe et al, 2001)
Kenya	Soros arquivados de pacientes que visitaram uma clínica rural	30,9	(Knobel et al, 2013)
Holanda	Pacientes Seres humanos em fazendas de gado leiteiro Moradores de fazendas de ovelhas leiteiras e não leiteiras Veterinarios Veterinarios e pacientes Agricultores, visitantes e contatos domiciliares Pacientes com história de cirurgia cardíaca valvar Grupo de alto risco Estudantes de medicina veterinária	16,9 72,1 66,7 ; 51,3 65,1 100; 84,7 92; 56; 50 20,4 10,7	(Hagenaars et al, 2014) (Schimmer et al, 2014) (De Lange et al, 2014) (Van den Brom et al, 2013) (Wielders et al, 2015) (Hackert et al, 2012) (Kampschreur et al, 2012) (Kampschreur et al, 2013)

	Mulheres grávidas que vivem em uma área de alto risco Doadores de sangue	18,7 9,0 4,4%	(de Rooij et al, 2012) (van der Hoek et al, 2011) (Slot et al., 2014)
Escócia	Trabalhadores, juntamente com amostras ambientais	41,9	(Wilson et al, 2010)
Senegal	População rural	24,5	(Mediannikov et al, 2010)
Slovakia	Estudantes de veterinária Funcionários de unversidade	16,9 (PI*); 58,4 (PII*) 38,0 (PI) ; 63,0 (PII)	(Dorko et al, 2011) (Dorko et al, 2008)
Espanha	Doadores de sangue Estudantes de medicina veterinária Pessoas saudáveis	23,1 11,2 15,3	(Bartolomé et al, 2007) (Valencia et al, 2000) (Cardeñosa et al, 2006)
Tailandia	Trabalhadores expostos a animais Pacientes População geral	26,3 4,2 4,2	(Chang et al, 2010) (Ko et al, 2000) (Ko et al, 2000)
Turquia	População geral Doadores de sangue Veterinarios Pessoas saudáveis População geral	13,5 32,3 8,0 7,1 7,8	(Gozalan et al, 2010) (Kilic et al, 2008) (Ergönül et al, 2006) (Berberoğlu et al, 2004) (Cetinkaya et al, 2000)
USA	Técnico laboratório de animais Veterinários militares Militares População geral Veterinarios	6,0 17,0 10,0 3,1 22,2	(Whitney et al, 2013) (Vest & Clark, 2014) (Anderson et al, 2011) (Anderson et al, 2009) (Whitney et al, 2009)

\*Anticorpos de fase I e anticorpos de fase II

### 1.6. Situação no Brasil

No Brasil, descrita pela primeira vez em 1953, a febre Q, apesar de ser uma zoonose amplamente distribuída, em discordância com diversas regiões do mundo, se resume a um completo desconhecimento. De incidência e epidemiologia desconhecidas, as escassas informações sobre a evidência sorológica em humanos e animais se restringem aos estados da Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (Lamas et al, 2009; Siciliano, 2008; Siciliano et al, 2007; Siciliano et al, 2006; Costa et al, 2006; Costa et al, 2005; Riemann, 1975; Riemann, 1974; Ribeiro-Netto et al, 1964; Borges, 1962; Valle, 1955; Travassos et al 1954; Brandão et al, 1953). Em um trabalho realizado no Rio de Janeiro com pacientes HIV reativos, atendidos em serviço de saúde na região administrativa de Jacarepaguá, foram identificados quatro pacientes do sexo feminino com anticorpos anti-*C. burnetii* e uma das pacientes referia contato com material de parto de uma cadela (Lamas, 2009). Estas informações se encontram compiladas no quadro 1.2.

Quadro 1.2. Publicações baseadas em sorologia relativas à febre Q no Brasil.

Ano de publicação	Tema da publicação	Referência
1953	Estudo sorológico em operários de um frigorífico.	Brandão et al. 1953
1954	Febre Q no Rio de Janeiro.	Travassos et al. 1954
1955	Investigação sobre a febre Q em São Paulo: estudo em tratadores de gado e em bovinos	Valle, 1955
1962	Evidência sorológica da febre Q em criadores no Brasil	Borges, 1962
1964	Prevalência entre ordenhadores e trabalhadores de gado leiteiro.	Ribeiro-Netto et al, 1964
1974	Anticorpos para o <i>Toxoplasma gondii</i> e <i>Coxiella burnetii</i> .	Riemann, 1974
1975	<i>Toxoplasma gondii</i> e <i>Coxiella burnetii</i> entre os trabalhadores de matadouros brasileiros.	Riemann, 1975
2005	Evidências sorológicas em indivíduos sadios da região de Juiz de Fora.	Costa et al, 2005
2006	Relato 16 casos de febre Q em Minas Gerais.	Costa et al, 2006
2006	Endocardite infecciosa, experiência em um hospital de cardiologia em São Paulo.	Siciliano et al, 2006
2007	Inquérito sorológico de <i>Coxiella burnetii</i> e <i>Bartonella spp.</i>	Siciliano et al, 2007
2008	Endocardite por <i>Coxiella burnetii</i> Relato de caso.	Siciliano, 2008
2009	Soroprevalência <i>Coxiella burnetii</i> em pacientes HIV positivos em Jacarepaguá.	Lamas et al, 2009

Em 2008 foi possível detectar pela primeira vez no Brasil um caso de febre Q, a partir da análise molecular, um caso de febre de origem obscura associada com trombocitose, cuja amostra de sangue foi PCR-positiva (Lemos et al, 2011). Investigação realizada subsequentemente em animais na propriedade do paciente possibilitou a identificação de amostras de leite, *swab* das células da região perianal e soro de animais da propriedade PCR-positivas (Mares-Guia et al, 2014). Estes resultados confirmam que a necessidade de investigação da provável fonte de infecção é de extrema importância principalmente na interação saúde pública e saúde animal.



Na última década, dois estudos em pacientes com endocardite hemocultura-negativa (EHN) foram publicados no Brasil. Um caso, em 2008, cuja análise histopatológica associada à coloração de Giménez do fragmento valvar reforçou o diagnóstico de febre Q com base na detecção de anticorpos anti-*C. burnetii*. O segundo estudo retrospectivo, realizado em um hospital de cirurgia cardíaca no Rio de Janeiro, com base em análise molecular (PCR), identificou DNA *C. burnetii* em uma das 51 amostras de fragmento de válvulas cardíacas de pacientes com EHN analisadas (Lamas et al, 2013; Siciliano, 2008).

Em concordância com a literatura internacional na última década, que comprovam o crescente número de casos de febre Q, mais de 10 casos foram confirmados nos últimos seis anos no estado fluminense, considerando, no entanto, que somente em junho de 2014 esta zoonose passou a ser de notificação compulsória (portaria no 1.271, de 6 de junho de 2014). Há que se registrar um caso de febre Q, diagnosticado previamente como osteoartropatia soronegativa em uma área urbana do município do Rio de Janeiro, cuja história epidemiológica apontou para um petshop como provável fonte de infecção (Rozental et al, 2012).

### **1.7. Infecção em Humanos – febre Q**

A infecção por *C. burnetii* pode se apresentar com manifestações clínicas agudas ou crônicas. No entanto, quase 60% dos casos de febre Q são assintomáticos. Entre os 40% dos pacientes sintomáticos, a maioria (38% dos 40%) desenvolve uma doença leve, sem a necessidade de hospitalização. Pacientes hospitalizados representam apenas 2% dos indivíduos infectados e apenas um em cada 10 (0,2%) desenvolve a febre Q crônica. Essas proporções correspondem aos dados obtidos a partir de análise dos casos confirmados no sul da França, onde as incidências de febre Q e a endocardite são, respectivamente, de 50/100.000 habitantes e em 1/ milhão de habitantes (Angelakis & Raoult, 2011; Maurin & Raoult, 1999).

A febre Q aguda sintomática se manifesta principalmente como uma doença febril autolimitada, pneumonia atípica, ou como uma hepatite granulomatosa, enquanto a endocardite é a apresentação mais comum da febre Q crônica. No entanto, considerando o amplo e inespecífico espectro clínico da febre Q, a doença deve ser sistematicamente considerada em pacientes febris com contato recente com animais parturientes (Quadro 1.3) (Angelakis & Raoult, 2011; Maurin & Raoult, 1999).

Quadro 1.3: Manifestações clínicas e complicações agudas em pacientes sintomáticos de febre Q aguda e os achados laboratoriais mais frequentes em pacientes com febre Q.

Achados clínicos	% dos pacientes com resultados indicados	Achados biológicos	% dos pacientes com resultados indicados
Febre	88-100	Contagem normal de leucócitos	90
Fadiga	97-100	Trombocitopenia	25
Calafrios	68-88	Aumento dos níveis de transaminases	45-85
Dor de cabeça	68-98	Aumento dos níveis de bilirrubina	9-14,3
Mialgia	47-69	Aumento dos níveis de fosfatase alcalina	27,7-57
Suores	31-98	Aumento dos níveis de $\gamma$ -glutamil transferase	25-75
Tosse	24-90	Aumento dos níveis de creatina fosfoquinase	29
Náusea	22-49	Aumento dos níveis de lactato desidrogenase	33,3-40
Vômitos	13-42	Aumento dos níveis de creatinina	29-40
Dor no peito	10-45	Taxa de sedimentação de eritrócitos elevada	43-87,5
Diarréia	5-22	Anticorpos de músculo liso	65
erupção cutânea	5-21	Anticorpos Antiphospholipase	50
Miocardite	0,5-1		
Pericardite	1		
Meningoencefalite	1		
Morte	1-2		

Fonte: Maurin e Raoult, 1999.

### 1.7.1. Febre Q Aguda

Após um período de incubação de 2 a 3 semanas, dependendo do inóculo de *C. burnetii*, o paciente desenvolve um quadro infeccioso agudo caracterizado por febre alta, cansaço, calafrios, mialgia e cefaleia. A manifestação clínica mais frequente da forma aguda é uma doença febril autolimitada associada com intensa cefaleia. Pneumonia atípica é também uma frequente apresentação clínica e o quadro clínico pode variar de pneumonia clinicamente assintomática diagnosticada na radiografia de tórax até insuficiência respiratória aguda, embora esta última continue a ser extremamente rara (Angelakis & Raoult, 2011).

A hepatite é outra apresentação frequente da febre Q aguda, geralmente identificada durante investigação laboratorial de pacientes com quadro hepático com níveis aumentados de aspartato aminotransferase [AST], alanina aminotransferase [ALT] e fosfatase alcalina. Hepatomegalia pode ser clinicamente detectável, mas a icterícia é rara (Angelakis & Raoult, 2011; Maurin & Raoult, 1999).

Além dos quadros descritos acima, sucintamente, a infecção por *C. burnetii* pode determinar também endocardite, osteomielite, febre Q na infância, manifestações neurológicas, exantema, febre prolongada sem causa aparente, trombocitopenia ou trombocitose reativa, além das complicações da febre Q aguda (Angelakis & Raoult, 2011; Angelakis & Raoult, 2010; Marrie, 1990).

### **1.7.2. Febre Q Crônica**

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

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

### **1.8. Infecção em Animais - coxielose**

Em contraste com a febre Q aguda humana, a infecção animal com *C. burnetii* é, na maioria dos casos, de forma surpreendentemente assintomática. Este fato implica na observação de que o termo coxielose é considerado uma designação mais apropriada da infecção do animal por *C. burnetii*.

Nos animais, durante a fase aguda, *C. burnetii* pode ser encontrada no sangue, pulmões, baço e fígado enquanto que durante a fase não ativa é apresentado como uma liberação persistente de *C. burnetii* nas fezes e urina (Angelakis & Raoult, 2010).

Capaz de infectar muitas espécies animais, incluindo mamíferos, aves e artrópodes, as infecções por *C. burnetii* são geralmente assintomáticas, embora nos mamíferos a infecção possa causar abortos e natimortalidade. Nestes animais, os sinais clínicos mais frequentes da infecção por *C. burnetii* podem ser conseqüentes à pneumonia, aborto, morte e parto de cordeiros, bezerros ou filhotes debilitados. Na maioria dos casos, o aborto ocorre no final da gestação, sem sinais clínicos específicos até que o aborto esteja prestes a acontecer, como observado com brucelose ou clamidiose. Fetos abortados parecem normais, mas placentas infectadas apresentam espessamento fibroso intercotiledonário e exsudatos descoloridos, que não são específicos para febre Q. Uma resposta inflamatória grave pode ser observada no miométrio e no estroma adjacente à área placentomal durante a gestação em cabras. Os trofoblastos aparecem alterados e espumosos, com inclusões bem definidas de *C. burnetii*, também encontradas em células multinucleares. A taxa de aborto pode variar de 3 a 80%,

embora altas taxas de aborto sejam raramente observadas, exceto em alguns rebanhos caprinos. Muitas vezes, o número de fêmeas que aborta no rebanho pode não ser suficiente para alertar o fazendeiro e os casos clínicos humanos geralmente que possibilitam identificar, muitas vezes, a infecção do rebanho (Maurin & Raoult, 1999).

Em bovinos, metrite é frequentemente a única manifestação da doença. Mamíferos infectados (ruminantes, gatos, cães, coelhos, pequenos roedores silvestres, etc.) liberam *C. burnetii* em produtos provenientes do parto, mas também no leite, urina e fezes. Curiosamente a liberação de *C. burnetii* no leite é mais frequente e dura mais tempo em vacas e cabras do que em ovelhas, mas, no entanto, estudos têm demonstrado que as ovelhas liberam mais e por mais tempo em descargas vaginais do que cabras e podem manter as bactérias em gestações subsequentes (Arricau-Bouvery et al 2005). *Coxiella burnetii* também pode ser recuperada a partir do leite por até 32 meses. Cabras liberam *C. burnetii* nas fezes antes e depois do parto e a duração média de excreção é de 20 dias (Angelakis & Raoult, 2010), tornando o ciclo de manutenção da bactéria mais complexo.

### **1.9. *Coxiella burnetii* em artrópodes**

Em muitos animais, uma bacteremia transitória com *C. burnetii* ocorre logo após a infecção. Assim, carrapatos têm a oportunidade de se tornarem infectados com *C. burnetii* durante o repasto sanguíneo. Mais de 40 espécies de carrapatos são naturalmente infectadas com *C. burnetii*, incluindo *Rhipicephalus sanguineus* encontrado em cães, *Haemaphysalis humerosa* em marsupiais, *Amblyomma triguttatum* em cangurus. Várias outras espécies têm sido identificadas naturalmente infectadas em diferentes partes dos Estados Unidos, como *Dermacentor occidentalis*, *Amblyomma americanum*, *Haemaphysalis leporis-palustris*, *Ixodes dentatus*, e *Otobius Magnini*. A transmissão experimental de *C. burnetii* de cobaias infectadas para cobaias não infectadas através de picada de carrapato foi realizada com *Ixodes holocyclus*, *Haemaphysalis bispinosa*, e *Rhipicephalus sanguineus*. Infecção experimental com *C. burnetii* também foi realizada em *Dermacentor andersoni*. *C. burnetii* se multiplica nas células do intestino ou do estômago de carrapatos infectados. Estes artrópodes expelem cargas pesadas de *C. burnetii* com as suas fezes sobre a pele do animal hospedeiro no momento da alimentação. A infecção dos ovários do carrapato foi demonstrada e pode levar à infecção germinativa da descendência, permitindo que a infecção por *C. burnetii* persista na população de carrapatos. *Coxiella burnetii* em carrapatos como nos mamíferos, se encontram na fase I e, portanto, são altamente infecciosos (Kumsa et al, 2015; Maurin & Raoult, 1999).

No entanto, os carrapatos não são considerados essenciais no ciclo natural da infecção por *C. burnetii* em animais de pecuária, embora animais com frequente e estreito contato com artrópodes

possam estar submetidos a outras condições que possibilitem a infecção por *C. burnetii*. Em contraste, em relação aos vertebrados silvestres, especialmente roedores, lagomorfos, e aves selvagens, os carrapatos podem desempenhar um papel importante na transmissão da coxielose. Quanto à participação de outros artrópodes, como ácaros, mosquitos, moscas, pulgas e piolhos, no ciclo e na manutenção do agente na natureza, os poucos estudos existentes são inconclusivos. Estudos realizados em outros artrópodes coletados de vacas, ovelhas e roedores não resultaram em isolamento de *C. burnetii* demonstrando que o papel desses artrópodes no ciclo natural de *C. burnetii* ainda continua desconhecido (Maurin & Raoult, 1999).

### **1.9.1. *Coxiella*, endosimbiontes e carrapatos**

Embora *C. burnetii* pertença à ordem Legionellales, até a presente data não está clara a sua origem evolutiva assim como não se tem informações sobre o seu ancestral e seu estilo de vida primário. A ordem Legionellales inclui muitas outras bactérias intracelulares que infectam espécies não vertebradas como, por exemplo, as espécies do gênero *Rickettsiella* em artrópodes.

Considerando que todas as cepas de *C. burnetii* identificadas foram coletadas de pacientes e animais durante surtos de febre Q, somente com o advento de sequenciação do gene de rRNA 16S como um marcador de código de barras universal de DNA em bactérias, foi possível identificar novos organismos “*Coxiella*-like” em espécies não vertebrados e em particular nos carrapatos. Curiosamente, todos estes organismos “*Coxiella*-like” estão intimamente relacionados, mas geneticamente distintos de *C. burnetii*, sugerindo que existe uma diversidade dentro do gênero *Coxiella*. No entanto, a natureza altamente conservada das sequências de genes 16S rRNA tem dificultado a análise para se estabelecer a exata relação entre *C. burnetii* e estes organismos “*Coxiella*-like”, e uma relação de clade monofilética é comumente assumida (Duron et al., 2015).

Até a presente data as bactérias “*Coxiella*-like” parecem ser restritas a carrapatos, sem relato de infecção em vertebrado. Duron e colaboradores demonstraram a redução genômica e a falta de quase todos os genes associados à patogenicidade do organismo “*Coxiella*-like” isolado de exemplar de *A. americanum* (Duron et al., 2015). Segundo estes autores, as bactérias “*Coxiella*-like” seriam endosimbiontes altamente prevalentes na população de carrapatos e que estariam envolvidas com interações mutualísticas em seus hospedeiros artrópodes. A análise da presença de IS1111 nos endosimbiontes “*Coxiella*-like” e nas bactérias do gênero *Rickettsiella* revelou que uma vasta gama de cópias IS1111 estava presente nos endosimbiontes “*Coxiella*-like” de carrapatos. Estes resultados mostram que IS1111 não é específica para *C. burnetii*, sugerindo que os ensaios de detecção de febre Q com base apenas neste elemento pode conduzir a erros de identificação com endosimbiontes “*Coxiella*-like”, fato que reforça a necessidade de

sequenciamento e da inclusão de oligonucleotídeos para outros genes bacterianos (Duron et al., 2015).

## **1.10. Diagnóstico Laboratorial**

### **1.10.1. Diagnóstico Sorológico**

Uma vez que o diagnóstico clínico é difícil, devido à similaridade com uma série de doenças infecciosas ou não infecciosas, na maioria dos casos o diagnóstico de febre Q é confirmado a partir dos testes sorológicos. Uma variedade de técnicas sorológicas está disponível, mas o teste de microimunofluorescência indireta tornou-se a técnica de referência (Angelakis & Raoult, 2010). O diagnóstico sorológico é fácil de ser estabelecido, embora anticorpos sejam geralmente detectados somente após 2-3 semanas do início da doença. Assim, os testes sorológicos devem ser realizados em amostras pareadas de sangue coletadas na fase aguda e de convalescência. Além disso, o teste sorológico permite a diferenciação de infecções de febre Q agudas e crônicas.

Outros métodos, além da imunofluorescência indireta (IFI), que têm sido usados incluem a microaglutinação, fixação de complemento, radioimunoensaio, teste de hemólise indireta, ELISA (“Enzyme-linked Immunosorbent Assay”), ELIFA (“Enzyme Linked Immuno Fluorescent Assay”), “dot immunoblotting”, e “Western blotting”. As técnicas mais comumente usadas são os testes de fixação de complemento, IFI, ELISA e microaglutinação. Apenas os dois primeiros métodos são disponíveis comercialmente (Maurin & Raoult, 1999; Fournier et al, 1998).

A IFI continua a ser a técnica de referência para o diagnóstico da febre Q e tem a vantagem de exigir apenas pequenas quantidades de antígeno - *C. burnetii* fase I e fase II com a cepa Nine Mile. A fase II do antígeno é obtida por crescimento de *C. burnetii* em cultura de células, enquanto o antígeno de fase I é obtido a partir de baço de camundongos infectados. A técnica de IFI é melhorada usando um absorvente de fator reumatóide para remover IgG antes da determinação dos títulos de IgM ou IgA. Durante a febre Q aguda, a soroconversão é geralmente detectada 7-15 dias após o início do quadro clínico e os anticorpos pela terceira semana em cerca de 90% dos casos. Um título de anticorpos IgG anti-fase II  $\geq 200$  e um título de anticorpos IgM anti- fase II  $\geq 50$  são considerados significativos, mas a escolha dos títulos de corte negativos depende da quantidade de estimulação antigênica na população estudada e pode variar de uma área para outra. Títulos de corte de exames comerciais são de 64. Febre Q crônica é caracterizada pela presença de anticorpos anti-fase I, e um título de anticorpos de IgG anti-fase I  $\geq 800$  é considerado altamente preditivo de endocardite de febre Q (Maurin & Raoult, 1999).

Reação cruzada é a maior fonte de confusão na interpretação dos resultados sorológicos, e estes podem variar de acordo com a técnica sorológica. Reações cruzadas têm sido descritas entre *C. burnetii* e *Legionella pneumophila*, *Legionella micdadei*, *Bartonella quintana* ou *Bartonella henselae*. Tais reações cruzadas devem ser consideradas no diagnóstico etiológico da pneumonia atípica, que pode ser causada tanto por *C. burnetii* quanto por *Legionella* ou da endocardite com hemocultura negativa que pode ser decorrente tanto de *C. burnetii* quanto por diferentes espécies de *Bartonella*. Um diagnóstico diferencial é facilmente estabelecido quando os títulos de anticorpos quantitativos contra ambos os antígenos de *C. burnetii* anti-fase I e anti-fase II são determinados (Maurin & Raoult, 1999). O teste de IFI em comparação com o ELISA mostrou as sensibilidades de 97,7% e 87,2% para IgG e 66,7% e 60,0% para anticorpos IgM de fase II e I, respectivamente e as especificidades de 100% e 90,0% para IgG e 75,9% e 64,7% para anticorpos IgM de fase II e I, respectivamente. IFI é adequado para o diagnóstico da febre Q e seu acompanhamento terapêutico e é um bom candidato para o rastreio de soros em grandes números (Slabá et al., 2005).

### **1.10.2 Diagnóstico Molecular**

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

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

PCR (LCN-PCR), um teste rápido de PCR que utiliza soro como amostra no Light-Cycler, visando uma multicópia 20-cópia da sequência elemento *htpAB* associado, foi adaptado para o diagnóstico tanto da febre Q aguda quanto da crônica. O ensaio de LCN-PCR pode ser útil no estabelecimento de um diagnóstico precoce da febre Q crônica. Devido à sua alta sensibilidade e especificidade, o elemento repetitivo IS *1111* é o melhor alvo para a detecção de *C. burnetii* em pacientes com febre Q ativa. O teste *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) demonstra uma nova possível alternativa para exame de soro fora de grandes laboratórios (Chen et al, 2014). Recentemente, a sequência completa do genoma de *C. burnetii* se tornou disponível, permitindo uma grande variedade de alvos de DNA (Angelakis & Raoult, 2010).

Berri e colaboradores mostraram que sensibilidade do Trans-PCR foi 100 vezes maior do que a sensibilidade obtida com PCR usando *primers* CB1-CB2. Este *primer* (CB1-CB2) foi desenhado com base na sequência de DNA do gene que codifica a superóxido-dismutase, enzima de *C. burnetii*. O comprimento do gene alvo é previsto para ser de 257 pb. A sensibilidade também foi testada em amostras de DNA extraído de esfregaços genitais coletados dos animais naturalmente infectados (Berri et al, 2000).

### **1.10.3. Isolamento Bacteriano**

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

Vários espécimes humanos são adequados para a detecção de *C. burnetii*, mas a sua disponibilidade depende da apresentação clínica. Todas as amostras, excluindo sangue total que deve ser mantido a 4°C, devem ser armazenadas em - 80 °C e encaminhadas em gelo seco para o laboratório de diagnóstico (Angelakis & Raoult, 2010).

Várias linhagens celulares podem ser usadas para culturas *in vitro*. Fibroblastos humanos de pulmão embrionário (células HEL) cultivadas em frascos de “shell” são usados mais rotineiramente por causa de sua alta susceptibilidade à infecção por *C. burnetii* e por ser de fácil manutenção (Angelakis & Raoult, 2010; Maurin & Raoult, 1999). Mais recentemente, com o desenvolvimento das pesquisas no campo da genômica funcional, Omsland e colaboradores (2009) conseguiram, através de um complexo meio nutriente construído a partir da reconstrução genômica, expressão “microarrays” e *fingerprinting* metabólico, o crescimento de *C. burnetii* em meio axênico. Este fato inédito, além de facilitar os estudos sobre a patogênese e a genética do organismo, possibilitará o isolamento bacteriano no futuro com menor custo e maior facilidade.



#### **1.10.4. Histopatologia Associada com Imunohistoquímica**

A detecção de *C. burnetii* em tecidos é especialmente indicada em pacientes que estão em tratamento para a febre Q crônica, principalmente nos casos de endocardite hemocultura negativa, na qual as vegetações da válvula cardíaca geralmente não são detectadas pelo ecocardiograma. A multiplicação intracelular de *C. burnetii* pode explicar porque estas vegetações são pequenas ou inexistentes nos pacientes com endocardite de febre Q. Neste cenário, as amostras podem ser testadas a fresco ou após fixação em formol e parafina. Imunodeteção é realizada usando técnicas de imunoperoxidase ou imunofluorescência com anticorpos policlonais ou monoclonais. Apenas esta última técnica pode ser usada em amostras em parafina (Angelakis & Raoult, 2010; Maurin & Raoult, 1999).

### **1.11. Tratamento e Medidas de Prevenção**

#### **1.11.1. Tratamento e monitoramento de pacientes com febre Q**

A doxiciclina tem a maior eficácia terapêutica contra *C. burnetii* e é o tratamento de escolha para a febre Q aguda em adultos, crianças com mais de 8 anos de idade, e em crianças de todas as idades com doença grave. Doxiciclina oral deve ser administrada durante 14 a 21 dias na dosagem de 100 mg duas vezes por dia para adultos e 2,2 mg / kg de peso corporal duas vezes por dia para crianças com menos de 45 kg. Quando as tetraciclina são contraindicadas, podem ser utilizados outros antibióticos, tais como trimetoprim / sulfametoxazol, fluoroquinolonas ou macrolídeos (Quadro 1.4). Os benefícios do uso de doxiciclina superam o risco potencial de coloração dos dentes permanentes em crianças abaixo de 8 anos de idade gravemente doentes ou internados com febre Q aguda. O tratamento deve ser dado nos primeiros três dias de doença para o máximo de eficácia e não deve ser adiada enquanto se aguardam os resultados de exames laboratoriais ou por causa do resultado laboratorial inicial negativo na primeira semana de doença (Angelakis & Raoult, 2010).

O tratamento profilático após uma exposição suspeita de *C. burnetii* não é recomendada, pois pode prolongar o período de incubação, e não impede que a infecção ocorra. Da mesma forma, o tratamento de infecções assintomáticas ou resolvidas não é recomendação de rotina, embora possa ser considerada em pacientes com fatores de risco para o desenvolvimento de infecções crônicas de febre Q (National Association of State Public Health Veterinarians and National Assembly of State Animal Health Officials. 2013).

Pacientes saudáveis, sem fator de risco identificado para o desenvolvimento de febre Q crônica, devem ser clinicamente avaliados e submetidos a testes serológicos por IFI seis meses após a infecção aguda. Pacientes com fatores de risco cardíaco ou outros para o desenvolvimento de doença crônica devem ser clinicamente avaliados e submetidos a testes

serológicos por IFI em 3, 6, 12, 18 e 24 meses após infecção aguda. As mulheres grávidas devem ser avaliadas clínica e sorologicamente, utilizando a IFI aos 3, 6, 12, 18 e 24 meses após o parto (National Association of State Public Health Veterinarians and National Assembly of State Animal Health Officials. 2013).

Pacientes com febre Q crônica devem ser encaminhados para um especialista em doenças infecciosas para acompanhamento, já que necessitam de terapia com antibióticos em longo prazo, utilizando uma combinação de doxiciclina e hidroxicloroquina, diagnósticos periódicos e, em longo prazo, de monitorização (National Association of State Public Health Veterinarians and National Assembly of State Animal Health Officials. 2013).

Quadro 1.4. Orientações para o tratamento da febre Q (Angelakis & Raoult, 2010).

Manifestação clínica	coorte de pacientes	Tratamento	Duração	Referencia
Febre Q aguda	Adultos	Doxiciclina (100 mg 2 x dia)	14 dias	CDC, 2015
		Fluoroquinolonas (200 mg 3 x dia ou pefloxacin (400 mg)	14 a 21 dias	Angelakis & Raoult, 2010
		Rifampin (1200 mg/dia)	21 dias	Angelakis & Raoult, 2010
	Grávidas	Trimetoprim (320 mg) e Sulfametoxazol (1600 mg/dia)	>5 semanas	Carcopino, 2007.
	Crianças (menos de 45kg)	Doxiciclina (2.2 mg/kg 2 x dia) max. 100mg	10 a 14 dias	CDC, 2015
Febre Q crônica	Adultos	Doxiciclina (100 mg 2 x dia) e hidroxicloroquina (200 mg 3 x dia)	>18 meses	CDC, 2015; Carcopino, 2007.
	Crianças	Trimetoprim (4-6 mg/kg) e Sulfametoxazol (20-30 mg/kg) 2 x dia	>18 meses	CDC, 2015; Lazzerini, Tickell, 2011.

### 1.11.2. Tratamento de animais

Mais pesquisas são necessárias para determinar a eficácia do tratamento de rebanhos inteiros ou animais individuais para prevenir ou controlar a liberação de *C. burnetii* e na prevenção de eventos adversos associados à gravidez com coxielose. O uso de tetraciclina na alimentação durante a gravidez não pode ser recomendado como medida de controle em rebanhos, devido à baixa biodisponibilidade do fármaco com a administração oral (National Association of State Public Health Veterinarians and National Assembly of State Animal Health Officials. 2013).

Com base em dados atuais, o uso de antibióticos na ausência de abortos em curso não se justifica. Quando os abortos são tratados em animais individualmente para prevenir eventos

adversos da gravidez, a via parenteral (duas injeções de oxitetraciclina a 20 mg / kg administrada com 20 dias de intervalo) no final da gestação pode ser útil, apesar dos dados escassos e inconclusivos. Além do mais, embora possa evitar abortos, o tratamento parenteral de cada animal não parece diminuir a disseminação do organismo em fluidos de nascimento ou mudar o status sorológico (National Association of State Public Health Veterinarians and National Assembly of State Animal Health Officials. 2013).

### **1.12. Profilaxia e Medidas de Prevenção**

Um cuidado especial deve ser tomado quando se introduz um novo animal em um rebanho livre de coxielose, considerando, no entanto, que o agente da febre Q é transmitido principalmente pelo ar. Durante surtos de febre Q, a contaminação de animais e do meio ambiente podem ser evitados ou reduzidos, destruindo placentas e fetos, de modo a evitar a sua ingestão por carnívoros domésticos ou silvestres que, conseqüentemente, podem disseminar a bactéria no ambiente. Se possível, os nascimentos devem ser confinados a uma localização específica e desinfetados sem induzir aerossóis (Rodolakis, 2009).

Como em todas as doenças zoonóticas, o controle da doença em animais vai influenciar o nível da doença observada no homem. Estratégias apropriadas de controle de carrapato e boas práticas de higiene podem diminuir a contaminação ambiental. Fluidos e as membranas fetais infectados, fetos abortados e materiais de cama contaminados devem ser incinerados ou enterrados, após desinfecção (Quadro 1.5). Além disso, o estrume deve ser tratado com cal ou cianeto de cálcio 0,4% antes de ser espalhado sobre os campos, o que deve ser feito na ausência de vento para evitar a propagação do microrganismo a longas distâncias. Embora seja muito caro, os animais infectados devem ser retirados dos rebanhos ou colocados em confinamento separados no momento do parto. Trabalhadores da indústria animal devem ser plenamente informados sobre os fatores de risco de contrair febre Q e os laboratórios devem ser dotados de dispositivos de segurança adequados e equipamentos (Angelakis & Raoult, 2010).

Vazamentos de materiais potencialmente infecciosos devem ser descontaminados imediatamente pelo uso de 0,5% hipoclorito, 5% de peróxido, ou soluções à base de fenol. Resíduos com risco biológico devem ser descontaminados por autoclavagem e os equipamentos/instrumentos contaminados por desinfetantes, autoclavados ou submetidos à fervura por 10 min. A forma esporo-like de *C. burnetii* pode, no entanto, ser resistente à desinfecção normal, ao hipoclorito de sódio, à radiação ultravioleta, assim como ao calor, dessecação, pressão, e stress oxidativo e osmótico (Madariaga et al., 2003).

Pasteurização a 72 °C durante 15 segundos e esterilização do leite de rebanhos infectados são regularmente recomendados mesmo que a via oral não seja a principal via de

transmissão (Arricau-Bouvery & Rodolakis 2005). A suspensão de *C. burnetii* em soluções aquosas de 0,5% de hipoclorito, 5% Lysol ou formalina a 5%, não inativam completamente o agente depois de 24 h a 24 ° C (Scott & Williams, 1990).

Quadro 1.5. Inativação de *C. burnetii* em relação a vários agentes físico-químicos (Scott & Williams, 1990; Madariaga et al., 2003).

	Agentes	inativação
Agentes Físicos	Temperatura de 65°C	30 minutos
	Radiações ultravioletas	Resistente
Agentes Químicos	Formol a 5 %	Resistente
	Lysol (5%)	Resistente
	Álcool etílico 70%	30 minutos
	Clorofórmio a 5%	30 minutos
	Hipoclorito de Sódio a 0,5%	Resistente

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

Três tipos de vacina têm sido propostas para fornecer a proteção humana contra a febre Q: i) a vacina de *C. burnetii* viva atenuada produzida e testada na Rússia, mas posteriormente abandonada devido à preocupação com sua segurança; ii) vacina de resíduo extraído em clorofórmio-metanol ou outras vacinas extraídas (testadas em animais, mas não em seres humanos) e iii) a vacina inativada por formalina de célula inteira (Q-Vax) considerada aceitável e segura para ser utilizada em seres humanos (Angelakis & Raoult, 2010). A Q-vax tem sido amplamente utilizada na Austrália e estudos realizados durante o período de 1981 a 1989 em 4000 indivíduos concluíram que a vacina fornece uma proteção completa e duradoura, evitando casos graves de febre Q. A vacina provoca apenas reações menores, incluindo edema e hiperemia e, mais raramente edema, no local de inoculação (Madariaga et al., 2003), mas até o momento não está disponível no Brasil.

## 2. JUSTIFICATIVA

Na última década frequentes surtos de febre Q vêm sendo identificados em diferentes regiões do mundo, chamando a atenção para esta zoonose de difícil controle. Estudos sorológicos e moleculares têm demonstrado que a febre Q é muito mais prevalente e dispersa do que se pensava (Hagenaars et al., 2014; Georgiev et al., 2013; Whitney et al., 2013; Anderson et al., 2009).

No Brasil, apesar da sua identificação na década de 1950, poucos estudos têm sido realizados, caracterizando uma ausência de informações sobre esta zoonose negligenciada cujo quadro clínico se assemelha a várias outras doenças, especialmente com a dengue e a influenza. Neste cenário, no qual os profissionais de saúde não têm qualquer conhecimento sobre a febre Q, os escassos relatos de casos registrados desta zoonose reforçam a hipótese de que o número deve ser muito maior do que vem sendo notificado mais recentemente no Brasil.

No município de Itaboraí foi identificado em 2008 o primeiro caso da febre Q confirmado por PCR no território brasileiro (Lemos et al, 2011). Durante o processo de investigação epidemiológica realizado na residência do paciente foi possível identificar não somente a presença de familiar infectado, mas também animais domésticos (Mares-Guia et al, 2014).

Diante do exposto, o presente estudo se justifica considerando a possibilidade de que a infecção por *C. burnetii* possa estar sendo confundida com outras doenças infecciosas, em especial com a dengue em áreas onde *C. burnetii* tem sido identificada, principalmente durante a ocorrência de epidemias de dengue como é o caso do estado do Rio de Janeiro. Assim, com a hipótese de que a febre Q possa estar ocorrendo na região de Itaboraí sem ser identificada, este estudo além de aumentar a capacidade de detectar casos desta zoonose no município, tem como atribuição contribuir com a vigilância das doenças infecciosas febris agudas.

Quanto ao estudo com animais, a identificação de cães, gatos, ovelhas e cabras infectados (Mares-Guia et al, 2014) associada com a informação de que os animais tinham sido transferidos para outras áreas do município aumenta a relevância de se investigar a presença de animais infectados por *C. burnetii*, levando em conta a complexidade do ciclo de manutenção da bactéria, no qual participam muitas espécies de animais domésticos e silvestres como verificado nos diversos estudos realizados no mundo (Angelakis & Raoult, 2011, Angelakis & Raoult, 2010).

Por fim, como no Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses, onde o estudo foi desenvolvido, se encontra alocado o Laboratório de Referência Nacional para Rickettsioses,

que tem como atribuições realizar diagnóstico laboratorial de rotina, estudos eco-epidemiológicos e de desenvolver pesquisas, todas as propostas apresentadas neste estudo objetivaram também auxiliar na identificação de áreas de risco para febre Q para aplicação de medidas de controle adequadas, além de aumentar o nosso conhecimento sobre esta zoonose de amplo espectro clínico totalmente negligenciada no Brasil.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

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

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Pesquisar anticorpos anti-*Coxiella burnetii* pelo teste de imunofluorescência indireta em amostras de soro de população humana e de animais no município de Itaboraí.
- Pesquisar anticorpos anti-*C. burnetii* pelo teste de imunofluorescência indireta em amostras de soro de casos humanos suspeitos de dengue internados no Hospital Municipal Desembargador Leal Junior (HMDJ), durante o período de 24 meses (2013-2014).
- Implantar a reação em cadeia da polimerase (PCR) *Nested* para pesquisa *C. burnetii*, utilizando *primers* desenhados pelo Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses
- Detectar e amplificar o genoma bacteriano pela técnica de *Nested-PCR* em amostras de pacientes com suspeita de dengue atendidos no Hospital Municipal Desembargador Leal Junior (HMDJ), durante o período de 24 meses (2013-2014).
- Realizar o sequenciamento nucleotídico de *C. burnetii* em amostras procedentes de casos humanos confirmados de febre Q no Hospital Municipal Desembargador Leal Junior (HMDJ), durante o período de 24 meses (2013-2014).
- Correlacionar os resultados laboratoriais obtidos com os dados clínico-epidemiológicos dos casos confirmados de febre Q no Hospital Municipal Desembargador Leal Junior (HMDJ), durante o período de 24 meses (2013-2014).
- Investigar a presença de infecção por *C. burnetii* pelos testes moleculares em amostras de vertebrados domésticos e silvestres oriundos das áreas de estudo no município de Itaboraí
- Verificar a presença de infecção por *C. burnetii* em artrópodes (carrapatos, pulgas e piolhos) coletados de vertebrados incluídos no estudo;

- Disponibilizar informações sobre a circulação de *C. burnetii*, com ênfase na vigilância epidemiológica e nas medidas de prevenção.



## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Este estudo faz parte do projeto sobre vigilância das rickettsioses com ênfase na febre Q no Município de Itaboraí e que obteve, para o estudo com população humana, aprovação pela Comissão de Ética Institucional (CEP/Fiocruz) sob o número 552/10 (ANEXO 1) e a colaboração do município de Itaboraí (ANEXO 2). As expedições de coleta de animais foram realizadas sob a Licença Permanente para coleta de material zoológico n° 13373 ICMBIO/IBAMA/SISBIO e Registro de Expedição n° 7262-1 ICMBIO/IBAMA/SISBIO.

É pertinente informar que o presente estudo foi desenvolvido no contexto da vigilância epidemiológica, considerando que os casos e surtos são rotineiramente investigados de acordo com diretrizes éticas dos serviços públicos de saúde que fazem parte da rede de assistência. Em relação ao teste diagnóstico, apenas uma alíquota das amostras de sangue, foi coletada pelos próprios técnicos de laboratório do hospital municipal.

### **4.2. LOCAL DE ESTUDO**

O estudo foi desenvolvido no município de Itaboraí (22°44'40"S, 42°51'34"O) (Figura 4.1), que se encontra localizado na região metropolitana do estado do Rio de Janeiro a 46 metros de altitude. A sua população estimada em 2013 foi de 225 263 habitantes (IBGE, 2013). Apresenta a extensão territorial de 430,374 km<sup>2</sup> (IBGE, 2015) distante 45 km da capital fluminense, com acesso pela rodovia federal BR101. No município observam-se áreas de vegetação composta em maior parte por pastagens, mata de encosta, mangues e brejos. Os remanescentes de matas são observados nos setores mais íngremes e elevados nas serras do Barbosão e do Lagarto. São matas tipicamente secundárias resultantes da regeneração natural, pois concentraram muita exploração de madeira para a obtenção de carvão e lenha no passado. No restante do município, as matas encontram-se muito fragmentadas e aparecem em locais isolados. O clima é tropical, chuvoso no verão e seco no inverno. Sua temperatura média anual é de 25°C. A economia se baseia em manufatura cerâmica (decorativa e utilitária), fruticultura, agricultura de subsistência, apicultura, pecuária extensiva, extrativismo mineral, indústria e setor terciário (comércio e serviços) (Portal oficial da prefeitura municipal de Itaboraí, 2015).

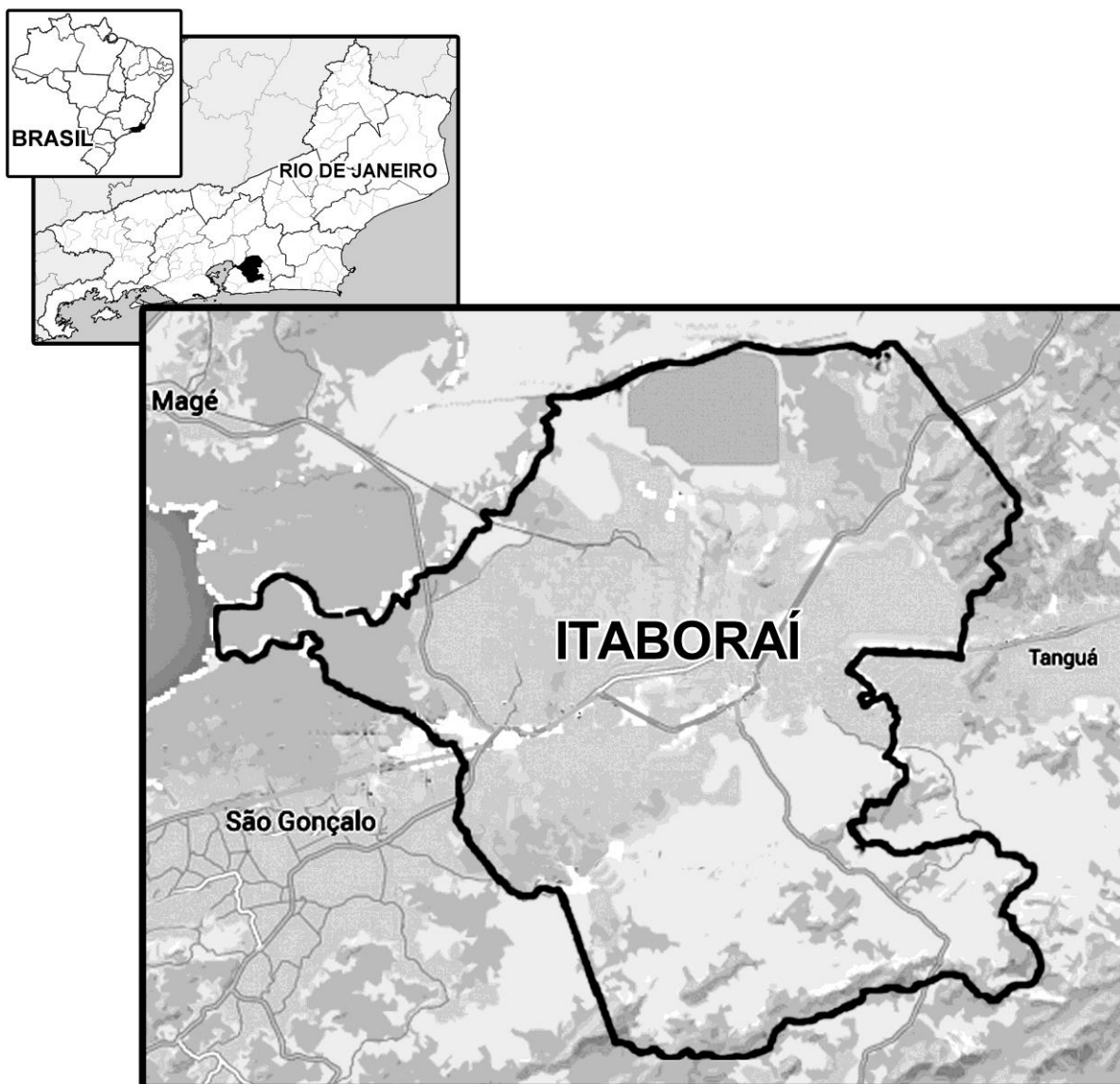


Figura 4.1: Mapa do Município de Itaboraí.

### 4.3. DESENHO DO ESTUDO

Para este estudo foi proposto um desenho epidemiológico descritivo seccional, dividido em quatro subprojetos que foram desenvolvidos três anos após a identificação do foco de infecção, durante o período de 2011 a 2015:

(i) O primeiro subprojeto foi desenvolvido no Hospital Municipal Desembargador Leal Junior (HMDJ), durante o período de março de 2013 a outubro de 2014. Todos os pacientes admitidos no HMDJ com suspeita de dengue, independente de sexo, idade, entre outras variáveis, e que moravam no município de Itaboraí e arredores, foram incluídos no estudo e amostras de sangue foram analisadas para pesquisa de infecção por *C. burnetii*. Os dados clínicos e epidemiológicos foram recuperados pelo serviço de vigilância do HMDJ utilizando a ficha epidemiológica para dengue do sistema de vigilância (SINAN).

(ii) No segundo estudo foi realizado, após a confirmação de febre Q em casos suspeitos de dengue, um estudo seccional com coleta de amostra de sangue de familiares, de animais domésticos e de artrópodes nas áreas de ocorrência de casos de febre Q em 2015.

(iii) No terceiro subprojeto, considerando os resultados do estudo desenvolvido em 2009, foram realizadas duas coletas, uma, em 2011 e outra, sete meses depois, em 2012, com o objetivo de monitorar os animais na residência do paciente.

(iv) No quarto subprojeto foi realizado o estudo de prevalência da presença do genoma de *C. burnetti* em animais silvestres na área de ocorrência de caso confirmado e em outras duas trilhas próximas. Com base nas diferentes situações eco-epidemiológicas e graus de conservação distintos foram selecionadas três áreas do município de Itaboraí (Figura 4.2): (i) **área 1**, uma área rural/peridoméstica, onde ocorreu a identificação do foco), (ii) **área 2**, uma área com fragmento de Mata Atlântica remanescente e (iii) **área 3**, área rural sob influência direta do empreendimento Complexo Petroquímico da Petrobrás (COMPERJ) de 2011 a 2012 (Figura 4.2).

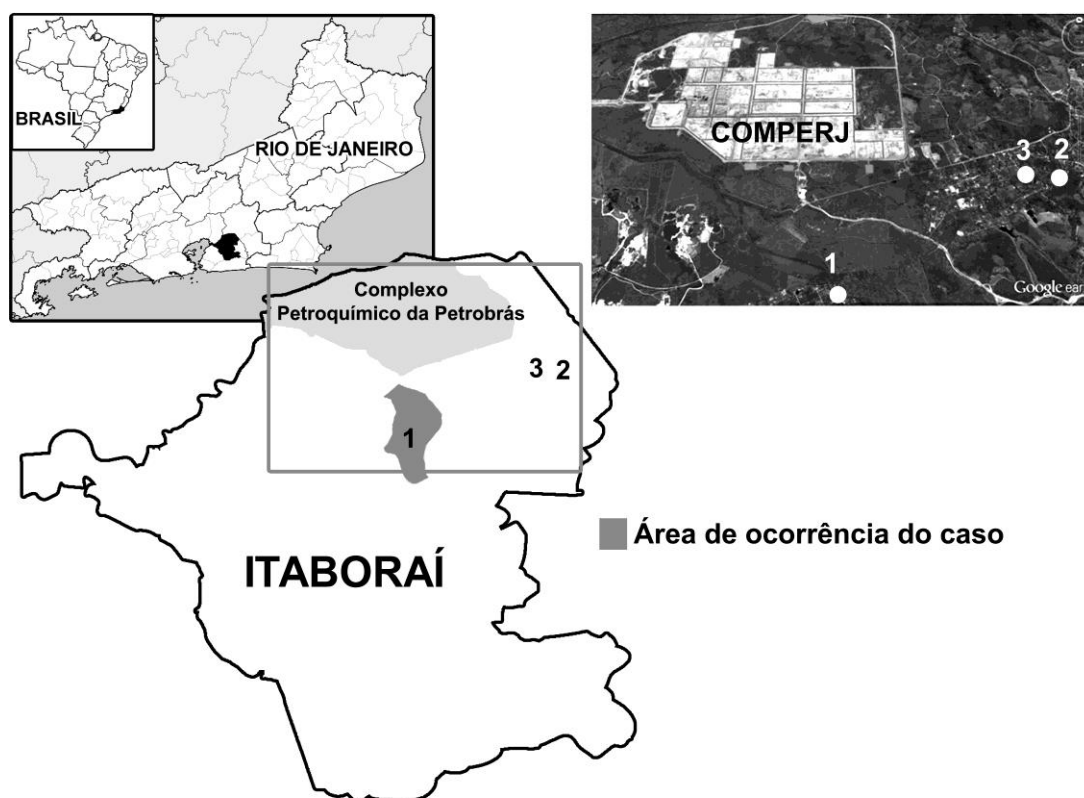


Figura 4.2: Mapa do Município de Itaboraí e áreas de coleta de animais silvestres, para pesquisa de infecção por *Coxiella burnetii*, com situações eco-epidemiológicas e graus de conservação distintos.

Na figura 4.3 é apresentado um sumário esquemático da metodologia utilizada no presente estudo, considerando os resultados obtidos nas pesquisas previamente realizadas no município de Itaboraí/RJ (Lemos et al 2011, Mares-Guia et al 2014).

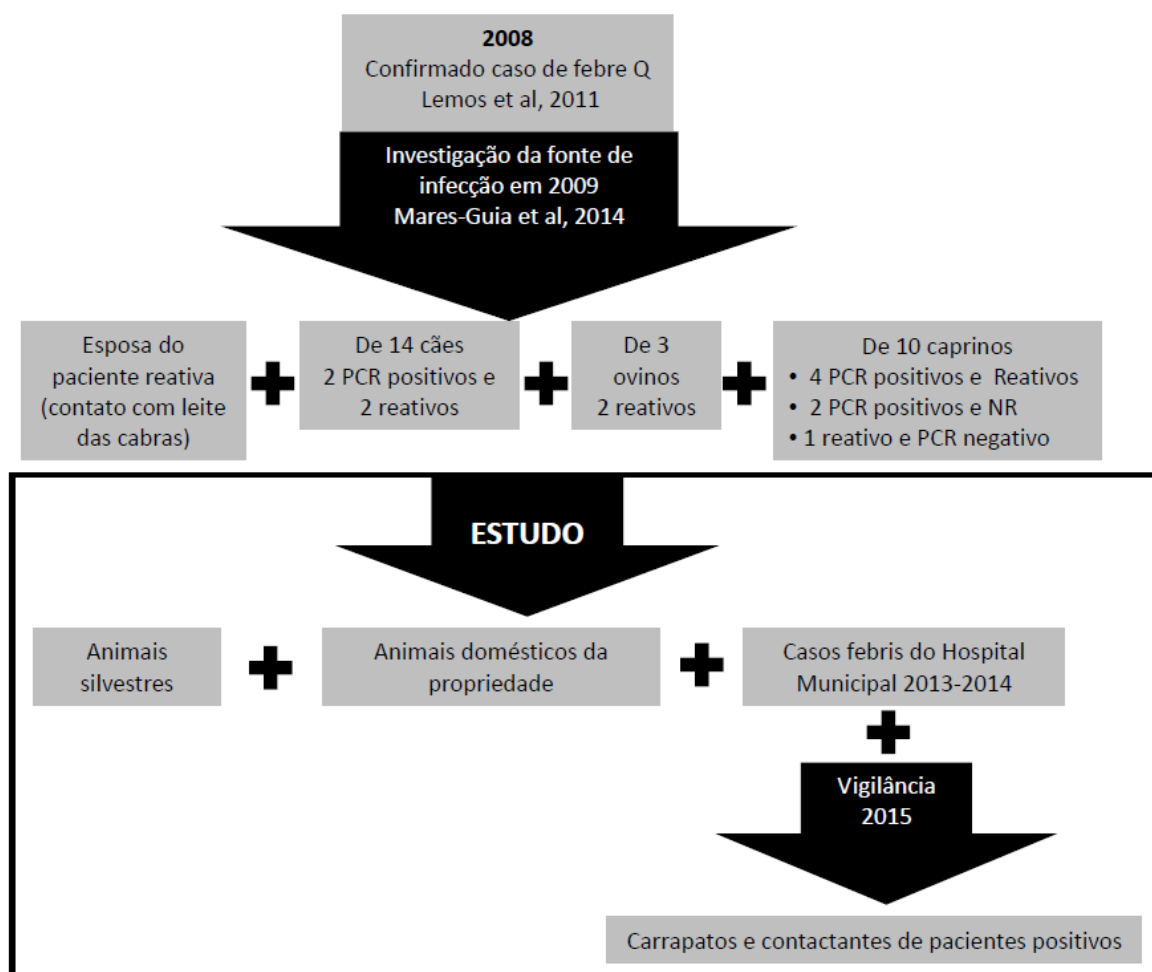


Figura 4.3: Sumário esquemático da metodologia utilizada na pesquisa de febre Q no município de Itaboraí/RJ durante o período de 2011 a 2015. As etapas com a população de estudo relacionadas à pesquisa se encontram no quadro retangular.

#### 4.4. ESTUDO EM HUMANOS

##### 4.4.1. Casos Suspeitos de Dengue

Com a colaboração e participação integrada dos profissionais da Secretaria Municipal de Saúde de Itaboraí, foi estabelecido que durante o período de estudo uma alíquota de amostras de sangue de todos os pacientes com suspeita de dengue atendidos por demanda espontânea no Hospital Municipal Desembargador Leal Junior, fossem acondicionadas, junto com a ficha do SINAN, para análise de *C. burnetii*. As amostras foram trazidas semanalmente para o

Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses, registradas e incluídas em um banco de dados para acondicionamento até a realização dos testes.

#### **4.4.2. Testes Utilizados para Dengue e Febre Q**

Os testes utilizados para detecção de dengue foram os preconizados pelo Ministério da Saúde. Detecção de anticorpos anti-IgM por ensaio de captura (Panbio®) e NS1 (Plateleia- BIORAD®). Para detecção de febre Q foram utilizados teste de imunofluorescência indireta (IFI) no soro e a análise molecular tanto em soro como coágulo como será devidamente apresentado no item 4.8.

#### **4.5. ESTUDO SECCIONAL COM COLETA DE AMOSTRA DE SANGUE DE FAMILIARES, DE ANIMAIS DOMÉSTICOS E DE ARTRÓPODES NAS ÁREAS DE OCORRÊNCIA DE CASOS DE FEBRE Q**

Diante dos resultados, com o apoio de profissionais da SMS de Itaboraí, visitas domiciliares foram, posteriormente, realizadas com o objetivo de avaliar a possibilidade de infecção por *C. burnetii* em familiares e nos animais eventualmente presentes em cada domicílio incluído neste estudo seccional, além de utilizar a identificação de artrópodes infectados como um determinante da contaminação do ambiente, já que ocorreram casos a mais de 5 km da área índice de foco.

Visitas domiciliares aos pacientes que criavam gatos foram realizadas com o objetivo de: a) avaliar clinicamente todos os gatos e cães presentes no domicílio e peridomicílio durante a visita, b) coletar sangue destes animais e c) coletar manualmente sem padronização, ectoparasitas dos animais domésticos incluídos no estudo.

Além das áreas de residência dos casos positivos que foram numeradas considerando cada paciente com o diagnóstico confirmado de febre Q, mais duas áreas foram incluídas, as áreas 10 e 11, onde se situava um revendedor de animais (cabras e ovelhas) e um local no Engenho Velho, onde residia um profissional da vigilância sanitária participante do trabalho de campo, respectivamente.

Após a primeira coleta, em janeiro de 2015, novas coletas foram subsequentemente realizadas nas áreas consideradas de risco visando à obtenção de informações sobre a ocorrência de quadro infeccioso compatível com febre Q entre os contatantes e familiares assim como a presença de animais infectados. Com o apoio do Serviço de Vigilância Epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde de Itaboraí, considerando a febre Q como doença de notificação compulsória, amostras de sangue de familiares e de animais domésticos foram coletadas em três trabalhos de campo realizados nos meses de março, agosto e setembro do mesmo ano.

#### **4.6. POPULAÇÃO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS**

Amostras de sangue periférico de animais, após assinatura do consentimento livre e esclarecido dos proprietários, foram coletadas na propriedade de onde foi identificado o caso índice (Lemos et al 2011) por membros da equipe do Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses. A coleta de sangue foi realizada pela autora deste projeto de tese, a médica veterinária responsável pelos procedimentos nos animais domésticos.

Em 2011 foram coletadas amostras de sangue de nove ovelhas introduzidas depois da primeira investigação em 2009, de mais seis felinos adultos e 13 caninos.

Em 2012, sete meses depois, foi realizada uma nova coleta, na qual foram obtidas amostras de sangue de seis ovinos e de sete filhotes de gatos. Dos filhotes foram coletados também *swab* de células perianais e pulgas. Adicionalmente, por solicitação do proprietário, material de tecido de uma ovelha com história de aborto repetido foi coletado também depois de ter sido submetida à eutanásia com pentobarbital sódico em super-dosagem.

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

#### **4.7. POPULAÇÃO DE ANIMAIS SILVESTRES**

A coleta das amostras foi realizada com a cooperação do Dr. Paulo Sérgio D' Andrea, do Instituto Oswaldo Cruz e da Dra. Cibele Bonvicino, do Instituto Nacional do Câncer, responsáveis pelos estudos taxonômicos e de sistemática de animais silvestres. Os animais foram coletados por meio de armadilhas, nos meses de outubro de 2011, maio de 2012, e setembro de 2012, nas três áreas do município de Itaboraí, com situações eco-epidemiológicas e graus de conservação distintos: (i) Área 1, uma área rural/peridoméstica, onde ocorreu a identificação do foco), (ii) área 2, uma área com fragmento de Mata Atlântica remanescente e (iii) área 3, área rural sob influência direta do empreendimento Complexo Petroquímico da Petrobrás (COMPERJ). Considerando que esta etapa do trabalho fez parte do projeto de mestrado em Biodiversidade e Saúde da aluna Caroline S. Fonseca, sob a orientação do Dr. Paulo D'Andrea e da Dr<sup>a</sup>. Elba Lemos, amostras de baço dos animais foram disponibilizadas para a pesquisa de infecção por *C. burnetii* a partir da análise molecular.

A captura de animais silvestres foi realizada exclusivamente na área de onde se originou o caso índice de febre Q (Lemos et al 2011), seguindo o protocolo previamente estabelecido pelo Ministério da Saúde assim como as normas de biossegurança preconizados, incluindo a utilização de equipamentos de proteção individual e de proteção respiratória (Lemos e D'Andrea, 2006). A primeira expedição foi realizada em outubro de 2011, a segunda, em maio/junho de 2012 e a última, em setembro de 2012. Os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina, conforme orientação veterinária, e tiveram seus dados bionômicos coletados (peso corpóreo e medidas de corpo e cauda) e amostras de tecido coletadas para o diagnóstico molecular de infecção por *C. burnetii*. A eutanásia dos animais foi realizada, preferencialmente, por exanguinação (sangria total) dos animais submetidos à anestesia profunda. No caso de impossibilidade de sua realização, foi realizada inoculação intracárdica de Cloridrato de Ketamina, numa super-dosagem acima de 50 mg/Kg de peso, conforme descrito em Rivera (2006).

#### **4.8. ANÁLISE LABORATORIAL**

Todas as amostras de sangue, tanto dos pacientes como de animais, além das amostras de secreção vaginal e retal e os artrópodes coletados nos animais, foram submetidas aos testes diagnósticos no Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses, conforme descrição abaixo.

##### **4.8.1. Teste Sorológico**

A detecção de anticorpos da classe IgG anti-*C. burnetii* foi realizada pelo teste de imunofluorescência indireta (IFI), seguindo o ponto de corte estabelecido pelo fabricante PANBIO/MEDVAX®, com os valores de corte de titulação superior ou igual a 64. As lâminas de IFI para febre Q contém organismos purificados nas fases I e II distribuídos em dois microcírculos dispostos lado a lado dentro do poço da lâmina (Figura 4.4).

O procedimento para a detecção qualitativa e quantitativa de anticorpos IgG humanos e de animais contra *C. burnetii* em amostras de soro, foi realizada, inicialmente com uma triagem na qual foram selecionadas amostras reativas com os títulos de 64, a partir da diluição inicial de 1:16 com PBS de diluição de soro (pH 7,2 ± 0.2). Adicionou-se 30µl da amostra diluída a 1:64 no orifício da lâmina contendo antígeno *C. burnetii* fase I e fase II fixado, além dos controles positivos e negativos. Após sua incubação em câmara úmida à temperatura aproximada de 37°C por 30 minutos, a lâmina foi lavada com PBS de lavagem (pH 9,0 ± 0.2), com subsequente adição do anticorpo IgG anti-humano (ou de animais) conjugado a Isotiocianato de fluoresceína (FITC). A lâmina foi incubada novamente, e subsequentemente, após lavagem e aplicação de glicerina (pH 9,7 ± 0.2) para montagem da lamínula, foi

analisada em microscópio de fluorescência em um aumento de 400x. Na presença de reatividade no teste de triagem, as amostras foram submetidas a crescentes diluições para a detecção da maior titulação com a quantificação do título final de reatividade das amostras (“end-point”).

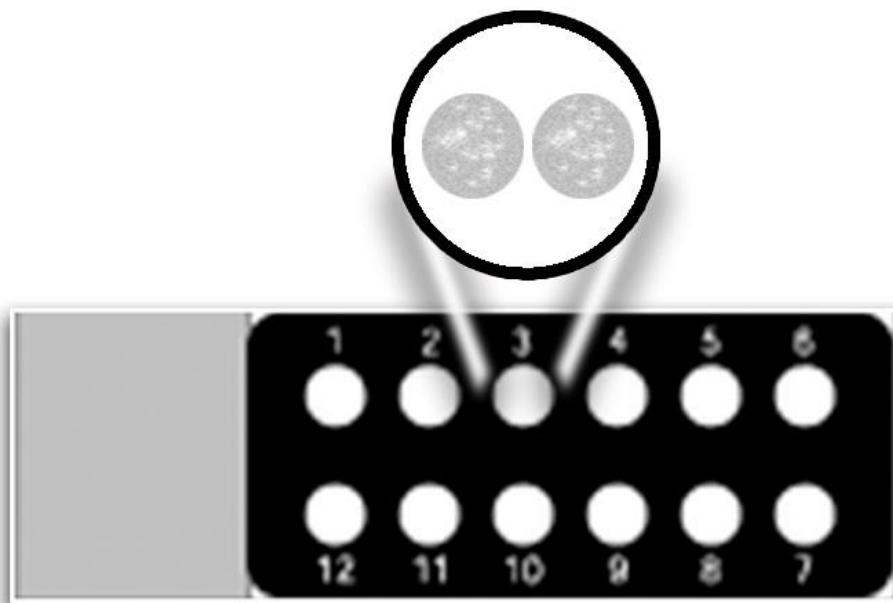


Figura 4.4: Figura esquemática da lâmina para teste de imunofluorescência indireta para febre Q com dois microcírculos dentro do poço contendo antígenos da fase II (microcírculo do lado esquerdo) e da fase I (microcírculo do lado direito). Teste comercial PANBIO/MEDVAX®

#### 4.8.2. Análise Molecular

Quanto à análise molecular, as amostras de sangue e do triturado dos artrópodes foram testadas para a presença de DNA bacteriano, utilizando oligonucleotídeos para o alvo *IS1111* (Hoover et al 1992; Willems et al 1994) (Quadro 4.1.). Os produtos de amplificação da PCR das amostras positivas foram purificados usando Kit Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Corp., Madison, WI, USA). As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando um kit BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) com um ABI Prism® 3130x Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). As sequências obtidas foram analisadas correlacionando-as com as sequências disponíveis na literatura, seguindo os protocolos previamente estabelecidos no laboratório com a utilização do software BioEdit e BLAST© ( Altschul et al. 1990).



Quadro 4.1: Oligonucleotídeos (*primers*) utilizados para detecção de *Coxiella burnetii* nas amostras humanas, de animais vertebrados e ectoparasitas, município de Itaboraí/RJ

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

Fonte: Hoover et al 1992; Willems et al 1994

As amostras coletadas de swabs anais e vaginais foram submetidas à análise molecular utilizando protocolo para extração de DNA descrito por Astobiza e colaboradores (2010) e Rodolakis e colaboradores (2007). Resumidamente, swabs vaginais e anais foram extensivamente lavados em 1 mL de PBS e 200 µL desta solução foi misturada com ATL (QIAmp kit DNA do sangue, Qiagen). Subsequentemente as amostras foram digeridas com proteinase K (8mg/mL) *overnight* a 56°C com adição de AL (QIAmp kit DNA do sangue, Qiagen) por 10 min a 70 °C, de acordo com o protocolo do fabricante para extração.

A amplificação por PCR foi realizada em um volume de 25µL de reação, que continha 1x de Tampão PCR 10 vezes, 0.2 µM de cada *primer* (Invitrogen, Life Technologies Brazil), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM mistura de dNTP (20mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato), 0,5 unidade de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 4 µL de DNA da amostra e água nucleose livre (Promega, Madison, WI, EUA).

A amplificação foi realizada em um termociclador (Applied Biosystem Veriti 96) e consistiu de desnaturação inicial por 5 min a 95° C, seguida de 40 ciclos consecutivos de desnaturação a 95° C por 30s, anelamento de 60° C por 30s e extensão a 72° C durante 1 min. Foi seguido por uma extensão final de 5 min a 72° C.

Para confirmar a amplificação, os produtos gerados foram separados em gel de agarose 1% corado com solução de Gel RED, visualizados e registrados em foto documentador.

O sequenciamento dos produtos de PCR procedentes de amostras biológicas foi realizado com análise das sequências genômicas obtidas correlacionando-as com as sequências de *C. burnetii* previamente descritas, seguindo os protocolos estabelecidos no laboratório.

#### 4.8.2.1. Procedimento de implantação de PCR *Nested*

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade e especificidade da reação em cadeia da polimerase (PCR) para pesquisa de *C. burnetii*, uma segunda reação (“*Nested*”) foi realizada utilizando um segundo par de *primers*, especificamente desenhado pelo Laboratório de

Hantavíroses e Rickettsioses, a partir dos *primers* utilizados nos protocolos previamente estabelecidos (QBT-1/QBT-2) (Quadro 4.2.).

Quadro 4.2: Oligonucleotídeos (*primers* internos) utilizados para detecção de *Coxiella burnetii* na segunda reação de PCR. Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses, IOC, FIOCRUZ.

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

Células Vero infectadas com *C. burnetii* adquiridas comercialmente (PANBIO/MEDVAX®) foram solubilizadas com tampões de PBS dos quais foram extraídos o DNA de 200 µl utilizando QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) seguindo as instruções do fabricante. Depois da extração, o DNA total foi quantificado no fluorômetro Qubit© (Invitrogen) 0,034 µg/ml. Posteriormente, soluções de DNA purificadas foram submetidas a crescentes diluições - de 1 até 10<sup>7</sup> diluições - a partir de 2 µL da solução extraída com 18 µl de água nuclease-free. Um volume de 4 µl de solução de DNA foi usado na PCR e nos ensaios de *Nested* PCR, com o objetivo de comparar a sensibilidade destes dois protocolos na detecção de DNA de *C. burnetii*.

A amplificação por PCR de gradiente foi realizada em um volume de 25µl de reação, que continha 1x de Tampão PCR 10 vezes, 0.2 µM de cada *primer* (Invitrogen, Life Technologies Brazil), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM mistura de dNTP (20mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato), 0,5 unidade de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 2 µL de DNA da amostra e água nuclease livre (Promega, Madison, WI, EUA).

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

#### 4.8.2.2. Procedimento de avaliação de especificidade da *Nested* PCR

Com o objetivo de avaliar a especificidade da *Nested* PCR, amostras de DNA de 15 outras bactérias foram usadas no PCR1 e nos ensaios de *Nested*. Algumas cepas de DNA bacteriano foram gentilmente cedidas pelo Dr. Ivano de Filippis, Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária-CRMVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ. As bactérias utilizadas nos experimentos foram *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Bartonella henselae*, *Borrelia burgdorferi* (Laboratório de Hantavirose e Rickettsiose, FIOCRUZ), *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00025 (ATCC 15442), *Brucella abortus* INCQS 00242 (ATCC 7705), *Legionella pneumophila subsp pneumophila* INCQS 00451 (NCTC 11232 ATCC 33155), *Staphylococcus aureus* CCBH 3853 (ATCC 25923), *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* (Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular) e *Listeria monocytogenes* (Laboratório de Zoonoses Bacterianas).

#### 4.8.2.3. Análise molecular com alvo *com1* (gene que codifica proteína da membrana externa de 27 kDa de *Coxiella burnetii*)

Com o objetivo de confirmar os resultados da reação em cadeia da polimerase (PCR) para pesquisa de *C. burnetii* do alvo IS1111, uma reação com outro alvo foi realizada em todas as amostras positivas de carrapatos. Estes *primers* foram desenhados a partir de uma região conservada do gene de *C. burnetii*, o alvo *com1*, a partir das sequências de genes de 21 amostras (Quadro 4.3). As especificidades de sequências destes iniciadores foram verificadas, pelo programa BLAST, utilizando as sequências na base de dados GenBank, não apresentando nenhuma homologia com as sequências de outros organismos bacterianos ou vírus (Zhang et al 1998).

Quadro 4.3: Oligonucleotídeos (*primers*) utilizados para detecção de *Coxiella burnetii* na reação de PCR com alvo *com1*.

Oligonucleotídeos	Sequências (5' – 3')	Temperatura anelamento	Tamanho do fragmento
OMP1	AGTAGAAGCATCCCAAGCATTG	54 °C	501bp
OMP2	TGCCTGCTAGCTGTAACGATTG		
OMP3	GAAGCGCAACAAGAAGAACAC	57 °C	438bp
OMP4	TTGGAAGTTATCACGCAGTTG		

Fonte: Zhang et al 1998.

Na primeira amplificação por PCR foi realizada em um volume de 25µl de reação, que continha 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM mistura de dNTP

(20mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato), 0.5  $\mu$ M *primer* OMP1, 0.5  $\mu$ M *primer* OMP2, (Invitrogen, Life Technologies Brazil), 2 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 4  $\mu$ L de DNA da amostra e água nuclease livre (Promega, Madison, WI, EUA). Na segunda amplificação a mistura da reação e as condições foram as mesmas, exceto pelos *primers* utilizados e pela quantidade de DNA da amostra de 1  $\mu$ L.

A reação foi realizada com a temperatura de desnaturação inicial de 94° C por 3 min, seguida de 36 ciclos consecutivos de desnaturação a 94° C por 1 min, anelamento a 54° C por 1min e extensão a 72° C por 1min, seguida posteriormente por uma extensão final a 72° C por 5 min. As temperaturas da segunda reação seguiram as mesmas descritas previamente exceto pela temperatura de anelamento que foi de 57° C (Zhang et al 1998).

#### **4.8.2.4. Procedimento de sequenciamento e análise filogenética**

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

#### **4.8.2.5. Análise dos artrópodes**

Os artrópodes coletados foram acondicionados em frascos de plástico sem conservantes em freezer -70°C. Todos os artrópodes, após terem sido submetidos à caracterização taxonômica a partir da utilização da chave para a fauna ixodológica brasileira, foram submetidos à limpeza externa e à criopreservação, para posterior análise molecular para pesquisa de *C. burnetii*. A desinfecção da superfície externa das amostras foi realizada em microtubos de 1,5 ml colocados em plataforma agitadora (Termomix em temperatura ambiente) com 500  $\mu$ l de hipoclorito de sódio a 10% e agitados por 5 minutos. Toda a solução de hipoclorito de sódio foi retirada com a adição de 1 ml de etanol a 70% nas amostras que foram submetidas à agitação por 5 min. Subsequentemente toda a solução de etanol foi

retirada e 1 ml de água destilada estéril foi adicionada às amostras que foram novamente agitadas por 5 minutos. Foi retirada toda a água destilada e repetida a lavagem com água por mais duas vezes. Os tubos contendo as amostras foram centrifugados rapidamente para retirada de toda a água e conservados até a preparação para extração. Posteriormente aos artrópodes triturados em nitrogênio líquido foram adicionados 180 µl de tampão ATL e 20 µl de proteinase K que foram misturados no vortex com posterior incubação a 56 °C no banho-maria *overnight*. No dia seguinte foram adicionados 200 µl de tampão AL seguindo uma etapa de incubação a 70°C em termobloco por 10 minutos. O processo de extração foi mantido usando kit comercial (QIAamp DNA, Qiagen), conforme informação do fabricante. Depois de extraído o DNA, as amostras foram submetidas à análise molecular.

## 5. RESULTADOS

Considerando que as amostras foram submetidas à análise molecular, antes de apresentar os resultados obtidos nas diferentes populações que compõem o presente estudo, serão descritas as informações referentes à implantação da *Nested* PCR.

### 5.1. Procedimento de Implantação de *Nested* PCR

#### 5.1.1. Sensibilidade da PCR e *Nested* PCR

O ensaio de PCR com os iniciadores de PCR para Trans-PCR detectou amplificação na primeira PCR até a diluição de  $10^4$  (Figura 5.1).

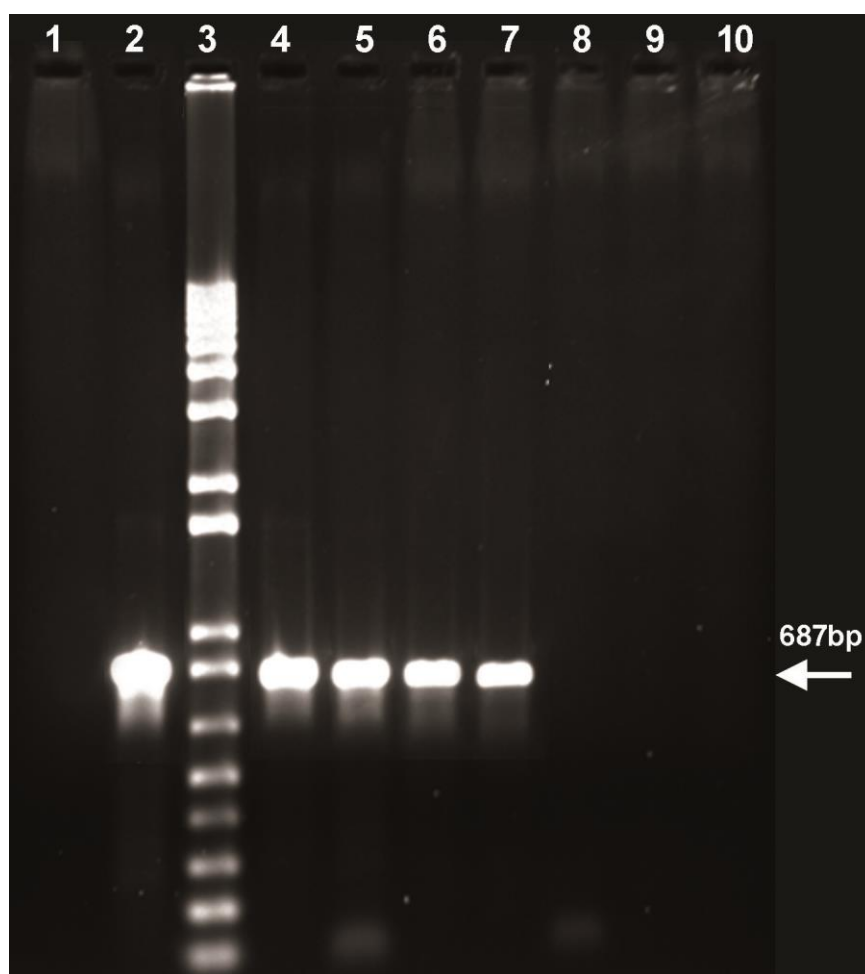


Figura 5.1: Ensaio de PCR com *Coxiella burnetii* realizadas com *primers* de trans-PCR como descrito no item Materiais e Métodos. Linhas; 1- o controle negativo; 2- *C. burnetii* suspensão 1x [0,034  $\mu\text{g/ml}$ ]; 3- 100 bp DNA ladder; 4- *C. burnetii* suspensão 10x; 5- *C. burnetii* suspensão  $10^2$ x; 6- *C. burnetii* suspensão  $10^3$ x; 7- *C. burnetii* suspensão  $10^4$ x; 8- *C. burnetii* suspensão  $10^5$ x; 9- *C. burnetii* suspensão  $10^6$ x; 10- *C. burnetii* suspensão  $10^7$ x.

Depois destes resultados, as diluições não amplificadas (de  $10^5x$  a  $10^7x$ ) foram submetidas a uma PCR de gradiente para selecionar as condições térmicas ótimas da reação e foi possível verificar a amplificação na diluição de  $10^5x$ . Os resultados obtidos que comprovam a maior sensibilidade dos *primers* de *Nested* PCR em relação ao Trans-PCR são apresentados na figura 5.2, na qual a amplificação dos produtos por electroforese em gel de agarose 1% corado com solução GelRed™ pode ser observada (Figura 5.2).

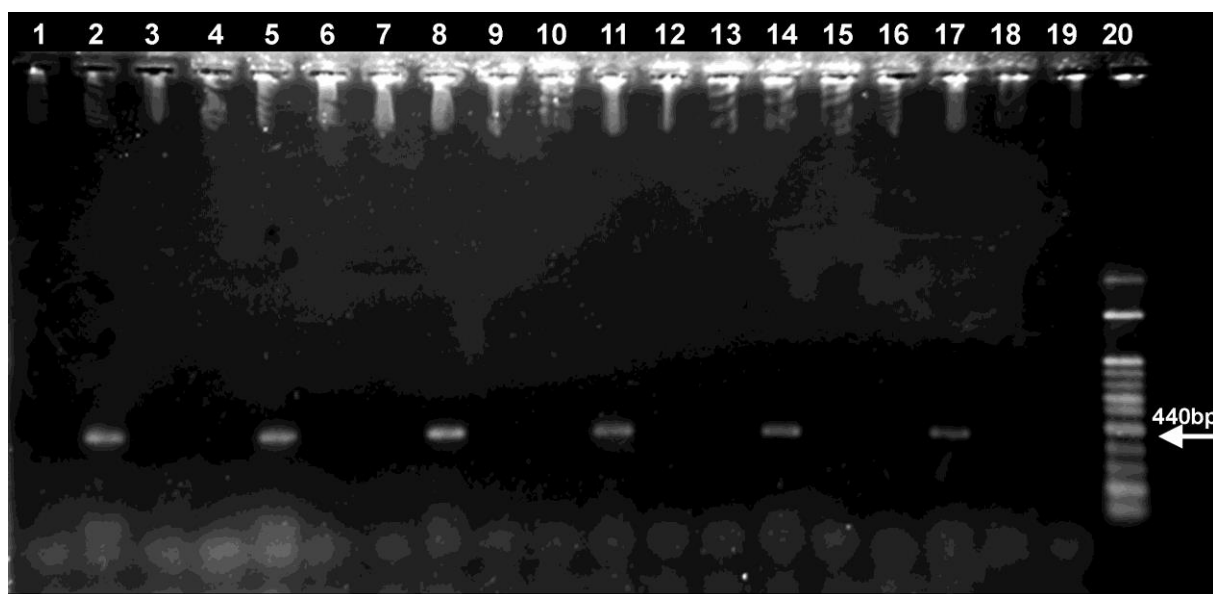


Figura 5.2: Ensaio de PCR com gradientes de *Coxiella burnetii* nas temperaturas de anelamento. Linhas; 1, o controle negativo; de 2 -4, suspensão *C.burnetii*  $10^5x$  a  $10^7x$  na temperatura de  $65^{\circ}C$ ; de 5-7, suspensão *C. burnetii*  $10^5x$  a  $10^7x$  na temperatura de  $66^{\circ}C$ ; de 8-10, suspensão *C. burnetii*  $10^5x$  a  $10^7x$  na temperatura de  $67^{\circ}C$ ; de 11-13, suspensão *C. burnetii*  $10^5x$  a  $10^7x$  na temperatura de  $68^{\circ}C$ ; de 14-16, suspensão *C. burnetii*  $10^5x$  a  $10^7x$  na temperatura de  $69^{\circ}C$ ; 17-19, suspensão *C. burnetii*  $10^5x$  a  $10^7x$  na temperatura de  $70^{\circ}C$ ; 20, 100 bp DNA ladder.

Com a definição destes parâmetros foi realizada a *Nested* PCR utilizando sempre controles negativos de reação com a temperatura de anelamento escolhida de  $66^{\circ}C$ . Com a inclusão deste procedimento foi possível aumentar a sensibilidade em 10x da reação com conseqüente melhoria na detecção do genoma parcial de *C. burnetii* (Figura 5.3)

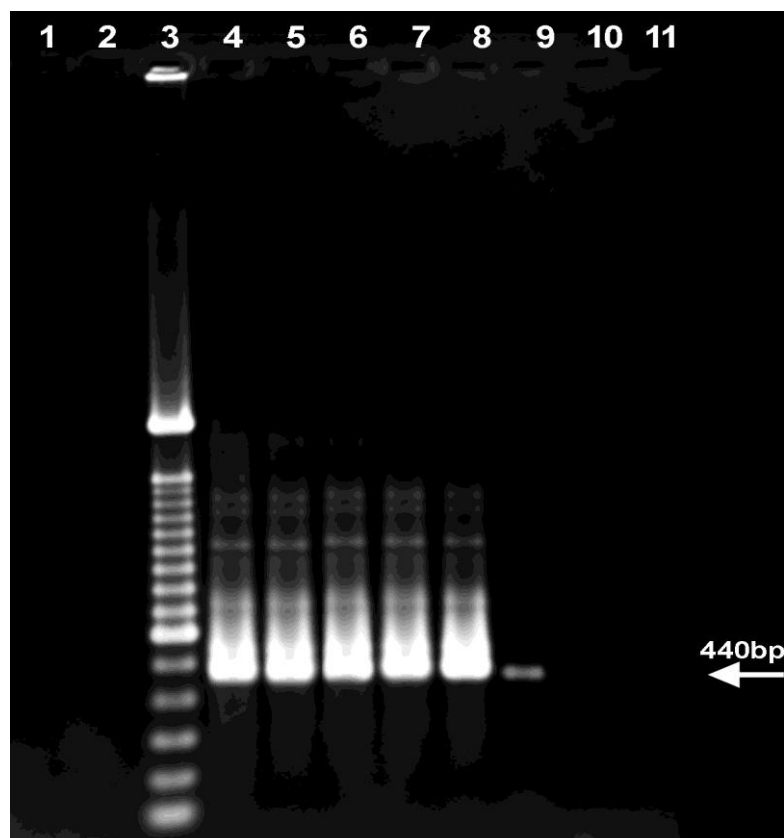


Figura 5.3: Ensaio de PCR com *Coxiella burnetii* realizadas com *primers* de *Nested* como descrito no item 4. Linhas; 1-, controle negativo da PCR1; 2 - controle negativo da PCR2; 3 - 100 bp DNA ladder; 4 - suspensão *C. burnetii* 1x; 5 -suspensão *C. burnetii* 10x; 6 - suspensão *C. burnetii* 10<sup>2</sup>x; 7 - suspensão *C. burnetii* 10<sup>3</sup>x; 8 - suspensão *C. burnetii* 10<sup>4</sup>x; 9 - suspensão *C. burnetii* 10<sup>5</sup>x; 10 - suspensão *C. burnetii* 10<sup>6</sup>x; 11 - suspensão *C. burnetii* 10<sup>7</sup>x.

### 5.1.2. Especificidade dos ensaios da PCR e *Nested* PCR

As amostras de DNA de 15 outras bactérias que foram usadas no PCR1 e nos ensaios de *Nested* PCR a fim de avaliar a especificidade não apresentaram nenhuma amplificação para estes microorganismos.

## 5.2. Casos de Febre Q e o Diagnóstico Diferencial com Dengue

### 5.2.1. Pacientes suspeitos de dengue atendidos no Hospital Municipal Desembargador Leal Junior em Itaboraí

Durante o período de março de 2013 a agosto de 2014, foram avaliados 272 pacientes com suspeita de dengue e que foram atendidos no HMDJ, em um total de 521 amostras, considerando tanto amostra de soro quanto de coágulo sanguíneo. Dos 272 pacientes com suspeita de dengue 167 (61,3%) foram confirmados. Na Tabela 5.1 se encontram os dados clínicos e epidemiológicos de 156 pacientes dengue-positivos e 102 dengue-negativos. Como



nem todos os pacientes tinham ficha epidemiológica completa somente 156 pacientes foram analisados. Observamos uma prevalência de febre, cefaleia e mialgia entre os confirmados para dengue. Porém a mialgia foi prevalente também nos dengue negativos.

Tabela 5.1. Distribuição e comparação dos dados clínicos e epidemiológicos entre 156 pacientes dengue-positivos e 102 dengue negativos diagnosticados no município de Itaboraí, Rio de Janeiro (2013-2014).

Variável	Dengue-positivo N=156, n(%)	Dengue-negativo N=102, n(%)	P*
<b>Gênero</b>			
Masculino	64 (41)	44 (33,1)	0.73
Feminino	92 (58,9)	58 (56,8)	
<b>Idade (anos)</b>			
≤ 10	5 (3,2)	8 (7,8)	<b>0.02</b>
11-20	33 (21,1)	30 (29,4)	
21-30	25 (16)	21 (20,5)	
31-40	36 (23)	9 (8,8)	
41-50	24 (15,3)	12 (11,7)	
≥51	33 (32,6)	20 (19,6)	
Febre	152 (97.4)	89 (87.2)	<b>&lt;0.01</b>
Dor de cabeça	146 (93.5)	82 (80.3)	<b>&lt;0.01</b>
Mialgia	134 (85.9)	81 (79.4)	0.17
Prostração	86 (55.1)	69 (67.6)	<b>0.04</b>
Nausea/vômito	98 (62.8)	55 (53.9)	0.15
Dor Retro-orbital	98 (62.8)	51 (50.0)	<b>0.04</b>
Artralgia	60 (38.4)	43 (42.1)	0.55
Diarreia	51 (32.6)	28 (27.4)	0.37
Petequias	47 (30.1)	19 (18.6)	<b>0.03</b>
Rash	36 (23.0)	14 (13.7)	0.06
Manifestações Hemorrágicas	2 (1.28)	1 (0.9)	1.00
Desordens Respiratórias	1 (0.64)	1 (0.9)	1.00

\*Estatisticamente-significancia valores de *p* estão em negrito.

### 5.2.2. Casos de Febre Q e Prevalência de Anticorpos anti-*Coxiella burnetii*

Considerando que as amostras de soro foram coletadas, dentro do contexto da vigilância da dengue, com menos de 5-7 dias do início das manifestações clínicas, a análise sorológica realizada teve como objetivo obter informações exclusivamente sobre a prevalência de anticorpos anti-*C. burnetii*. Assim, diante da impossibilidade de se obter uma segunda amostra de sangue que pudesse viabilizar o diagnóstico sorológico confirmatório de febre Q, no qual é necessária a análise de duas amostras pareadas de soro coletadas em um período médio de 10-14 dias entre elas, os resultados obtidos mostram que 10% (26/272) dos pacientes atendidos no período foram reativos para *C. burnetii* (Tabela 5.2).

Em relação à análise molecular, em nove pacientes foi detectado o genoma da proteobactéria representando, aproximadamente, 3.3% dos casos febris suspeitos de dengue que foram atendidos no hospital durante o período de estudo. O sequenciamento dos produtos de PCR procedentes das amostras biológicas foi realizado com análise das sequências genômicas obtidas, correlacionando-as com as sequências de *C. burnetii* previamente descritas. Os resultados da análise confirmaram a elevada similaridade entre as nove amostras (99-100%) e com as sequências de *C. burnetii* depositadas no GenBank (Tabela 5.3). Nenhuma amostra com anticorpos anti-*C. burnetii* foi PCR positiva para febre Q e somente um paciente com febre Q apresentou, concomitantemente, anticorpos anti-IgM por ensaio de captura (Panbio®) e NS1 (Plateleia- BIORAD®), indicando co-infecção com vírus da dengue (Tabela 5.3).

Tabela 5.2. Resultados sorológicos através de imunofluorescência indireta (IFI) e moleculares das amostras de soro e coágulo dos pacientes atendidos no Hospital Municipal Desembargador Leal Junior (HMDLJ) de 2013-2014.

Ano	IFI		PCR	
	2013	2014	2013	2014
	Nº reativos (total)	Nº reativos (total)	Nº positivos (total)	Nº positivos (total)
Pacientes atendidos no HMDLJ				
soro	23(246)	3(26)	6*(246)	- (26)
coágulo	-----	-----	3**(233)	- (13)

IFI foi realizado no soro.

\*PCR realizada em soro;\*\* PCR realizada em coágulo.

Com relação às manifestações clínicas mais comuns apresentadas, a tríade - febre, cefaleia e mialgia -, foi igualmente prevalente tanto nos casos da dengue quanto da febre Q. É pertinente observar que esta tríade também foi referida nos pacientes dengue-negativos (Tabela 5.1).

Tabela 5.3. Distribuição das idades e manifestações clínicas de nove pacientes com diagnóstico de febre Q - confirmados pela PCR, em Itaboraí e em áreas do entorno, Rio de Janeiro, Brasil (2013-2014).

Paciente	Idade/Gênero	Data de coleta da amostra (mês/ano)	Manifestações Clínicas **	Numero de acesso ao GenBank
Paciente 1*	78/M	Abril/13	F, DC, M, P, N/V, A	KP645185
Paciente 2	15/F	Abril/13	F, DC, M, P, N/V, OM	KP645186
Paciente 3	28/F	Maió/13	F, DC, M, R, N/V, OM	KP645187
Paciente 4	16/M	Maió/13	F, DC, M, P, OM	KR091975
Paciente 5	13/F	Setembro/13	F, RO, A, OM	KP645188
Paciente 6	8/M	Setembro/13	F, P, OM	KP645189
Paciente 7	67/M	Outubro/13	F, DC, M, P, N/V, RO, A	KP645190
Paciente 8	62/F	Outubro/13	F, DC, M, N/V, RO, A, OM	KP645191
Paciente 9	25/F	Novembro/13	F, DC, M, P, N/V, A	KR091976

\*Paciente 1 teve confirmada a presença de dengue por anticorpos anti-IgM por ensaio de captura (Panbio®) e NS1 (Plateleia- BIORAD®), indicando co-infecção com vírus da dengue.

\*\*Febre (F); Dor de cabeça (DC); Mialgia (M); Prostração (P); Nausea/Vômito (N/V); Dor Retro-orbital (RO); Artralgia (A); Outras manifestações clínicas (OM): Diarréia; Petequias; Rash; Dor Abdominal.

Na figura 5.4 é apresentada a distribuição dos casos confirmados de febre Q. Além do município de Itaboraí, onde sete casos foram confirmados e o estudo foi realizado, os municípios vizinhos, São Gonçalo e Tanguá foram incluídos, considerando a procedência dos outros dois casos de febre Q.

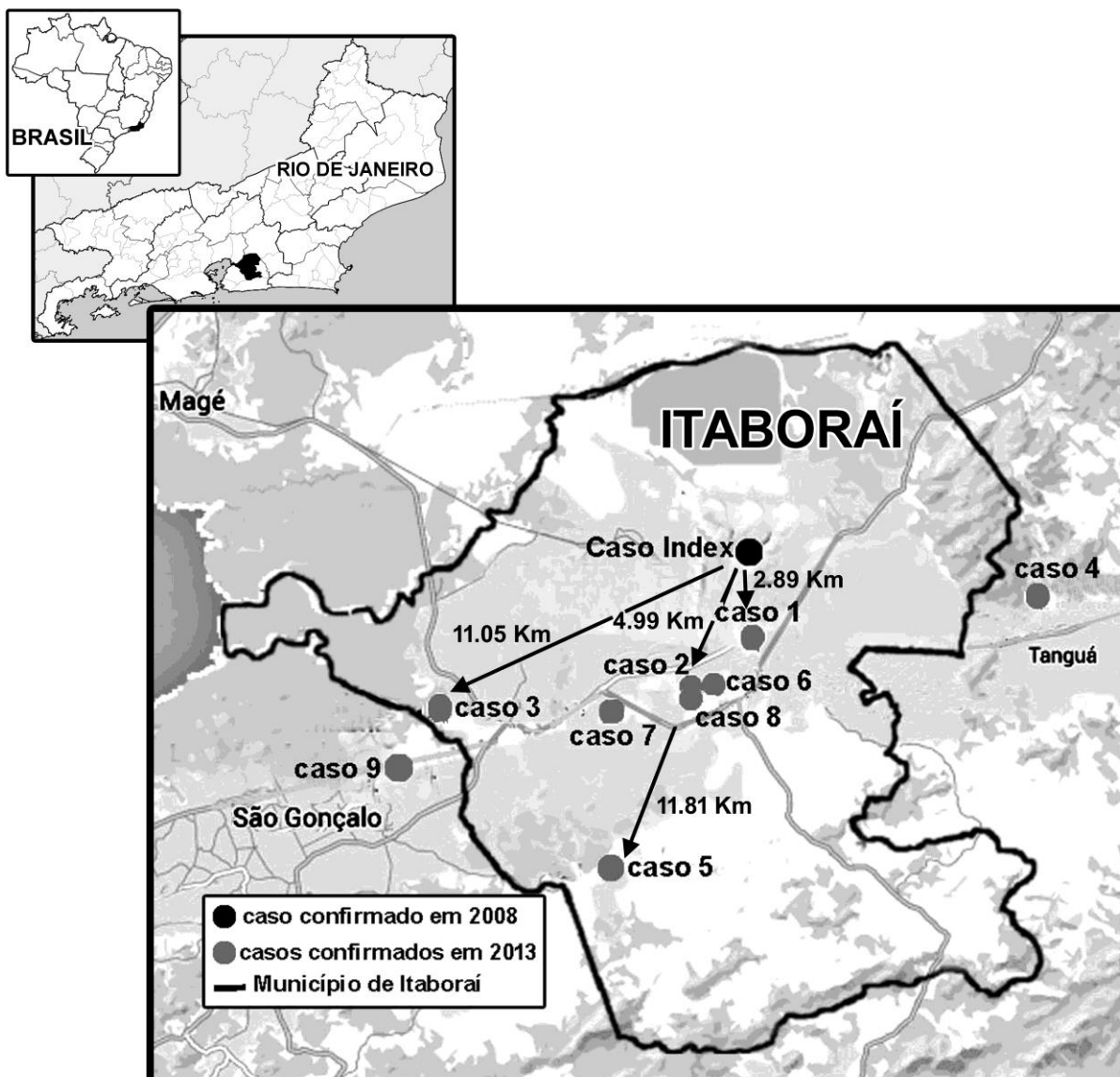


Figura 5.4: Mapa demonstrando a localização dos casos de febre Q identificados em 2013 no município de Itaboraí e nos municípios limítrofes, assim como as distâncias entre os pontos mais próximos e os mais distantes do caso index confirmado em 2008.

### 5.3. Estudo Seccional com Coleta de Amostra de Sangue de Familiares, de Animais Domésticos e de Artrópodes nas Áreas de Ocorrência de Casos de Febre Q

O trabalho de campo no município de Itaboraí foi realizado, no contexto do Laboratório de Referência Nacional para Rickettsioses, sempre com a presença do coordenador da vigilância epidemiológica para a realização das visitas domiciliares. As áreas foram definidas de acordo com os casos dos pacientes e estes foram numerados na ordem de identificação. As localidades dos casos 4 e 9 não puderam ser visitadas, pois se encontravam fora do município.

Em relação às áreas 2, 6 e 7, também não foram visitadas devido à ausência de informações das fichas epidemiológicas. Na área 1, o paciente não tinha animais e não foram encontrados artrópodes. No entanto, diante da presença de um cão sem raça definida errante que se encontrava a 1 km aproximadamente da residência do caso confirmado na área 1, ectoparasitas foram coletados deste animal, com a inclusão, assim, de mais uma área, denominada área 10.

As investigações foram conduzidas principalmente nas áreas que se encontravam a uma distância máxima de 12 km da área do caso index onde foi detectado o foco inicial. Como as áreas mais distantes apresentavam características perirurais, com presença de sítios e animais (Figura 5.5), foram selecionadas outras áreas do entorno das áreas onde ocorreram os casos positivos para coleta com distância adicional de 1 a 2 km das mesmas. As distâncias entre as áreas que foram selecionadas para esta etapa do estudo se encontram descritas na Tabela 5.4.

Tabela 5.4: Distâncias em quilômetros entre as áreas onde foram realizadas as coletas de artrópodes, no município de Itaboraí/RJ no período de 2015. A numeração corresponde às áreas com casos de febre Q e as letras, significam a inclusão de áreas do entorno.

	Área 1	Área 2	Área 3	Área 5	Área 5A	Área 5B	Área 5C	Área 8	Área 10	Área Índice
Área 1	0.00	3.25	11.44	10.00	10.03	09.80	7.87	6.81	1.27	2.89
Área 2	3.25	0.00	8.77	6.99	6.97	6.78	4.80	3.74	2.07	4.99
Área 3	11.44	8.77	0.00	8.38	8.25	8.64	7.43	5.24	10.11	11.05
Área 5	10.00	6.99	8.38	0.00	0.18	0.40	2.31	5.25	8.92	11.81
Área 5A	10.03	6.97	8.25	0.18	0.00	0.45	2.19	5.14	8.92	11.70
Área 5B	09.80	6.78	8.64	0.40	0.45	0.00	2.23	5.29	8.70	11.83
Área 5C	7.87	4.80	7.43	2.31	2.19	2.23	0.00	3.24	6.75	9.56
Área 8	6.81	3.74	5.24	5.25	5.14	5.29	3.24	0.00	5.49	7.56
Área 10	1.27	2.07	10.11	8.92	8.92	8.70	6.75	5.49	0.00	3.24
Área Índice	2.89	4.99	11.05	11.81	11.70	11.83	9.56	7.56	3.24	0.00



Figura 5.5: Características dos ambientes onde foram feitas as coletas de artrópodes no município de Itaboraí para pesquisa de infecção por *Coxiella burnetii*, em 2015, A numeração das fotos corresponde às áreas, além de áreas em seu entorno, onde casos de febre Q foram confirmados.

Após a coleta de forma seccional em janeiro de 2015, outras coletas foram realizadas nos meses de maio, agosto e setembro do mesmo ano. Na figura 5.6. é apresentada, em um mapa georreferenciado, a distribuição dos casos de febre Q, no qual é possível verificar a densidade populacional assim como a distribuição da vegetação em relação às áreas incluídas no estudo..

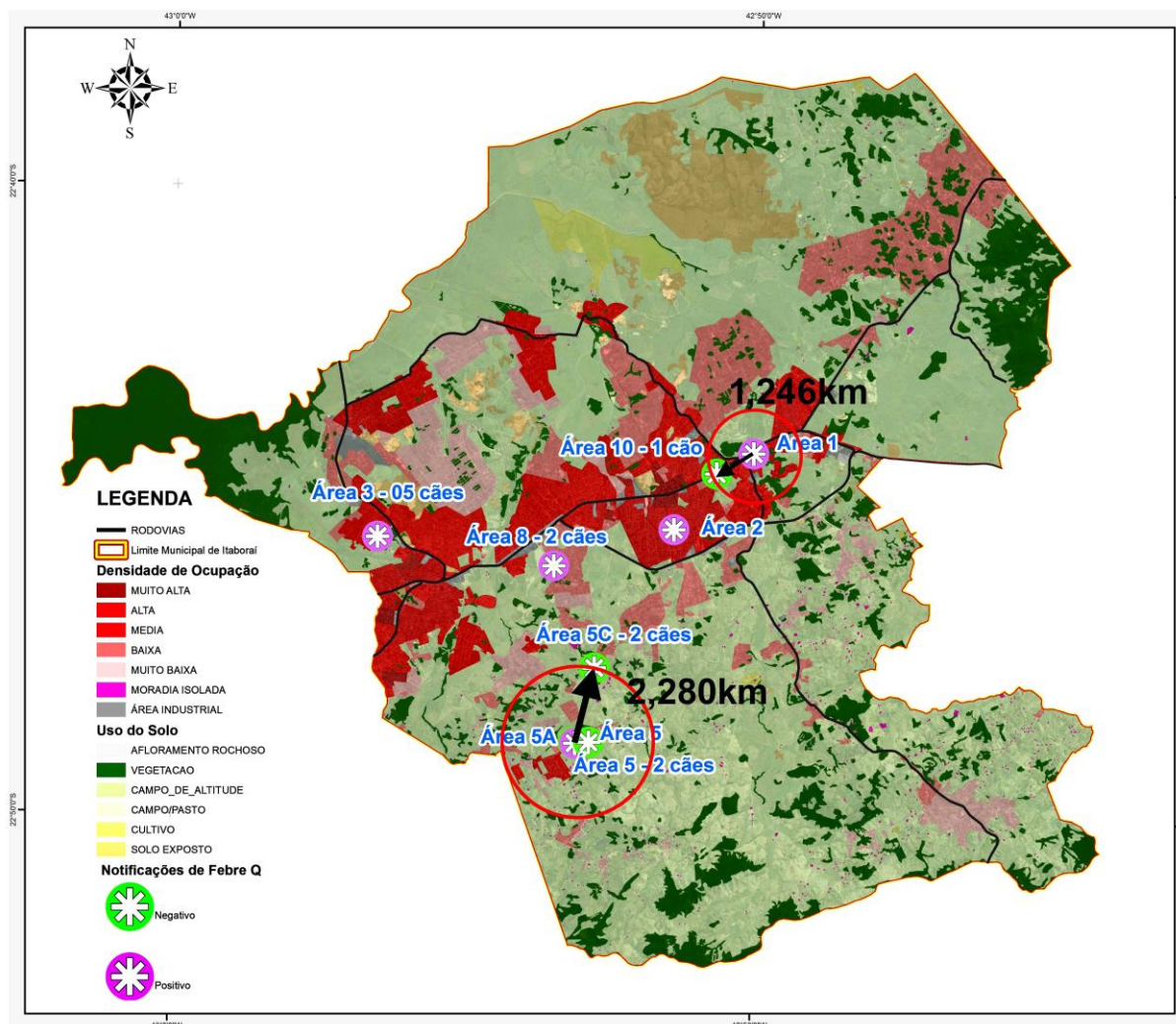


Figura 5.6: Mapa de georreferenciamento das áreas de coletas de artrópodes no município de Itaboraí/RJ, onde casos de febre Q foram confirmados durante o período de vigilância de febre Q nos casos suspeitos de dengue que foram atendidos no Hospital Municipal Desembargador Leal Júnior no período de 2013 e 2014 e as áreas do entorno.

Na tabela 5.5 são apresentados os resultados da análise dos 283 artrópodes que foram coletados em áreas mais distantes do local de ocorrência dos casos de febre Q em 2008 e 2013, além das localidades no entorno cuja distância considerada foi de, no máximo, 2 km do provável local do foco.

Tabela 5.5: Coleta de artrópodes nas áreas de residência dos casos confirmados de febre Q e em áreas no entorno, em 2015, no município de Itaboraí/Rio de Janeiro.

JANEIRO – data de coleta 30/01/15					
Local	Hospedeiro	Identificação	No de artrópodes	Taxonomia	PCR/ Nested
<b>Área 3</b> Gebara Paciente 3 positiva febre Q	Canino	Cão 1 Pretinha	18 ♀	<i>R.sanguineus</i>	N
			13 ♂	<i>R.sanguineus</i>	N
		Cão 2 Kira	16 ♀	<i>R.sanguineus</i>	N
			8 ♂	<i>R.sanguineus</i>	50 P
		Cão 3 Polêmico	7 ♂	<i>R.sanguineus</i>	56 e 59 P
			4 ♀	<i>R.sanguineus</i>	N
		Cão 4 Xuxa	20 ♀	<i>R.sanguineus</i>	79 e 83 P
			5 ♂	<i>R.sanguineus</i>	89 P
		Cão 5 Preta mãe	8 ♀	<i>R.sanguineus</i>	N
			4 ♂	<i>R.sanguineus</i>	N
		1 ninfa	<i>R.sanguineus</i>	N	
Ambiente	Ambiente	3 ♀	<i>R.sanguineus</i>	N	
Pesquisador	Pesquisador	1 ninfa	<i>R.sanguineus</i>	N	
<b>Área 5</b> Cabuçu Paciente 5 positiva febre Q	Canino	Cão 1	4 ♀	<i>R.sanguineus</i>	N
			3 ♂	<i>R.sanguineus</i>	N
		Cão 2	4 ♀	<i>R.sanguineus</i>	N
			3 ninfas	<i>R.sanguineus</i>	N
<b>Área 5A</b> Cabuçu (Entorno)	Equino	Equi 1	7 ♀	<i>Dermacentor nitens</i>	N
<b>Área 5C</b> Cabuçu Entorno Sítio	Canino	Cão 1	13 ♂	<i>R.sanguineus</i>	133 P
			2 pulgas	<i>Ctenocephalides canis</i>	N
		3 ninfas	<i>R.sanguineus</i>	N	
	Equino	Equi 2	5 ♀	<i>A. sculptum</i>	154 P
			3 ♂	<i>A. sculptum</i>	N
<b>Área 8</b> Bela Vista Paciente positiva febre Q	Canino	Cão 1	2 ♀	<i>R.sanguineus</i>	N
			4 ♂	<i>R.sanguineus</i>	N
		Cão 2	2 ♀	<i>R.sanguineus</i>	N
			1 ♂	<i>R.sanguineus</i>	N
<b>Área 10</b> Fazenda São Marcos	Canino	Cão 1	1 ninfa	<i>R.sanguineus</i>	N
<b>Área 11</b> Engenho Velho entorno	Canino	Cão 1	2 ♀	<i>R.sanguineus</i>	N
			1 ♂	<i>R.sanguineus</i>	N
		Cão 2	8 ♀	<i>R.sanguineus</i>	N
			4 ♂	<i>R.sanguineus</i>	N
<b>Artrópodes</b>		<b>Total</b>	<b>180</b>		

P – positivo; N – negativo

MARÇO – data de coleta 25/03/15					
Local	Hospedeiro	Identificação	No de artrópodes	Taxonomia	PCR/ Nested
<b>Área 3</b> Gebara	Canino	Cão Preta mãe	7 ♀	<i>R.sanguineus</i>	N
			6 ♂	<i>R.sanguineus</i>	N
		Cão	21 ♀	<i>R.sanguineus</i>	N



Paciente positiva febre Q		Kira	10 ♂	<i>R.sanguineus</i>	N
		Cão 5 Pretinha	4 ♀	<i>R.sanguineus</i>	N
			2 ♂	<i>R.sanguineus</i>	N
<b>Artrópodes</b>		Total	<b>50</b>		

P – positivo; N – negativo

**AGOSTO – data de coleta 10/08/15**

Local	Hospedeiro	Identificação	No de artrópodes	Taxonomia	PCR/ Nested
Área 3 Gebara Paciente positiva febre Q	Canino	Cão Pôlemico	1 ♀	<i>R.sanguineus</i>	N
			1 ♂	<i>R.sanguineus</i>	N
Área 5 Cabuçu Paciente positiva febre Q	Canino	Cão Rebeca	1 ♂	<i>R.sanguineus</i>	N
			1 ninfa	<i>R.sanguineus</i>	N
<b>Artrópodes</b>		Total	<b>4</b>		

P – positivo; N – negativo

**SETEMBRO – data de coleta 25/09/15**

Local	Hospedeiro	Identificação	No de artrópodes	Taxonomia	PCR/ Nested
Área 3 Gebara Paciente positiva febre Q	Canino	Cão xery	10 ♀	<i>R.sanguineus</i>	N
			16 ♂	<i>R.sanguineus</i>	N
			6 ninfas	<i>R.sanguineus</i>	414 P
		Cão Pôlemico	18 ninfas	<i>R.sanguineus</i>	N
<b>Artrópodes</b>		Total	<b>49</b>		
<b>TOTAL DE CARRAPATOS</b>					<b>283</b>

P – positivo; N – negativo

Nesta etapa do projeto, foram coletadas, além de carrapatos, amostras de sangue de contactantes, amostras de sangue, swab anal e vaginal dos animais das áreas de onde casos de febre Q foram confirmados. As amostras positivas foram sequenciadas. Os resultados obtidos na análise das amostras dos contactantes e dos animais se encontram nas tabelas abaixo (Tabela 5.6 a 5.9). Os números de acesso do GenBank se encontram na tabela 5.10.

Tabela 5.6: Resultados sorológicos obtidos pelo teste de imunofluorescência indireta (IFI) e moleculares (PCR) em amostras de sangue de contactantes dos casos de febre Q no município de Itaboraí, maio de 2015.

Registro	Data de Coleta	Área	Nome	sexo	Idade	Material	Sorologia IFI	PCR	
							COX IgG	PCR1	Nested
LRP0041/15	25/03/15	3	Contactante 1	F	11a	soro	NR < 1:64	---	---
LRP0042/15	25/03/15	3	Contactante 1	F	11a	coágulo	---	---	---
LRP0043/15	25/03/15	3	Contactante 1	F	11a	sangue EDTA	---	N	N
LRP0044/15	25/03/15	3	Contactante 2	F	26a	soro	NR < 1:64	---	---
LRP0045/15	25/03/15	3	Contactante 2	F	26a	coágulo	---	---	---

LRP0046/15	25/03/15	3	Contactante 2	F	26a	sangue EDTA	---	N	N
LRP0047/15	25/03/15	3	Contactante 3	M	55a	soro	NR < 1:64	---	---
LRP0048/15	25/03/15	3	Contactante 3	M	55a	coágulo	---	---	---
LRP0049/15	25/03/15	3	Contactante 3	M	55a	sangue EDTA	---	N	N
LRP0050/15	25/03/15	3	Contactante 4	F	47a	soro	NR < 1:64	---	---
LRP0051/15	25/03/15	3	Contactante 4	F	47a	coágulo	---	---	---
LRP0052/15	25/03/15	3	Contactante 4	F	47a	sangue EDTA	---	N	N
LRP0053/15	25/03/15	3	Contactante 5	M	59a	soro	NR < 1:64	---	---
LRP0054/15	25/03/15	3	Contactante 5	M	59a	coágulo	---	---	---
LRP0055/15	25/03/15	3	Contactante 5	M	59a	sangue EDTA	---	N	N
LRP0056/15	25/03/15	3	Contactante 6	F	34a	soro	NR < 1:64	---	---
LRP0057/15	25/03/15	3	Contactante 6	F	34a	coágulo	---	---	---
LRP0058/15	25/03/15	3	Contactante 6	F	34a	sangue EDTA	---	N	N
LRP0059/15	25/03/15	3	Contactante 7	M	32a	soro	NR < 1:64	---	---
LRP0060/15	25/03/15	3	Contactante 7	M	32a	coágulo	---	---	---
LRP0061/15	25/03/15	3	Contactante 7	M	32a	sangue EDTA	---		

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

Tabela 5.7. Resultados sorológicos obtidos pelo teste de imunofluorescência indireta (IFI) e moleculares (PCR) em amostras de sangue de animais nas propriedades de ocorrência de casos de febre Q no município de Itaboraí, março de 2015.

Registro	Data de Coleta	Área	ANIMAL	Material	Sorologia IFA	PCR	
					COX IgG	PCR1	<i>Nested</i>
LRP0062/15	25/03/15	3	Canino Kira	soro	NR < 1:64	---	---
LRP0063/15	25/03/15	3	Canino Kira	coágulo	---	---	---
LRP0064/15	25/03/15	3	Canino Kira	sangue EDTA	---	N	N
LRP0065/15	25/03/15	3	Canino Kira	swab vaginal	---	N	N
LRP0066/15	25/03/15	3	Canino Kira	swab anal	---	N	N
LRP0067/15	25/03/15	3	Canino Pretinha	soro	NR < 1:64	---	---
LRP0068/15	25/03/15	3	Canino Pretinha	coágulo	---	---	---
LRP0069/15	25/03/15	3	Canino Pretinha	sangue EDTA	---	N	N
LRP0070/15	25/03/15	3	Canino Pretinha	swab vaginal	---	N	N
LRP0071/15	25/03/15	3	Canino Pretinha	swab anal	---	N	N
LRP0072/15	25/03/15	3	Canino Polêmico	soro	NR < 1:64	---	---
LRP0073/15	25/03/15	3	Canino Polêmico	coágulo	---	---	---
LRP0074/15	25/03/15	3	Canino Polêmico	sangue EDTA	---	P	P/S
LRP0075/15	25/03/15	3	Canino Polêmico	swab anal	---	N	N
LRP0076/15	25/03/15	3	Canino Xuxa	sangue EDTA(plasma)	NR < 1:64	N	N
LRP0077/15	25/03/15	3	Canino Preta mae	sangue EDTA(plasma)	NR < 1:64	N	N
LRP0078/15	25/03/15	3	Canino Preta mae	swab vaginal	---	N	N
LRP0079/15	25/03/15	3	Canino Preta mae	swab anal	---	N	N

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

Tabela 5.8: Resultados sorológicos obtidos pelo teste de imunofluorescência indireta (IFI) e moleculares (PCR) em amostras de sangue de casos de febre Q e de contactantes no município de Itaboraí, agosto de 2015.

Registro	Data de Coleta	Área	Nome	sexo	Idade	Material	Sorologia IFA	PCR	
							COX IgG	PCR1	<i>Nested</i>
LRP0100/15	10/08/15	5	Contactante 1	F	39	soro	NR < 1:64	---	---
LRP0101/15	10/08/15	5	Contactante 1	F	39	coágulo	---	---	---
LRP0102/15	10/08/15	5	Contactante 1	F	39	sg	---	N	N

						EDTA			
LRP0103/15	10/08/15	5	Paciente 5	F	15	soro	NR < 1:64	---	---
LRP0104/15	10/08/15	5	Paciente 5	F	15	coágulo	---	---	---
LRP0105/15	10/08/15	5	Paciente 5	F	15	sg EDTA	---	N	N
LRP0106/15	10/08/15	5	Contactante 2	F	16	soro	NR < 1:64	---	---
LRP0107/15	10/08/15	5	Contactante 2	F	16	coágulo	---	---	---
LRP0108/15	10/08/15	5	Contactante 2	F	16	sg EDTA	---	N	N
LRP0122/15	17/08/15	3	Paciente 3	F	31a	soro	NR < 1:64	---	---
LRP0123/15	17/08/15	3	Paciente 3	F	31a	coágulo	---	---	---
LRP0124/15	17/08/15	3	Paciente 3	F	31a	sangue EDTA	---	N	N

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

Tabela 5.9: Resultados sorológicos obtidos pelo teste de imunofluorescência indireta (IFI) e moleculares (PCR) em amostras de sangue de animais das propriedades de ocorrência de casos de febre Q no município de Itaboraí, em agosto e setembro de 2015.

Registro	Data de Coleta	Área	ANIMAL	Material	Sorologia IFA		PCR	
					COX	IgG	PCR1	<i>Nested</i>
LRP0109/15	10/08/15	5	canino Rebeca	soro	NR < 1:64	---	---	---
LRP0110/15	10/08/15	5	canino Rebeca	coágulo	---	---	---	---
LRP0111/15	10/08/15	5	canino Rebeca	sg EDTA	---	N	N	N
LRP0112/15	10/08/15	5	canino Rebeca	Swab vaginal	---	N	N	N
LRP0113/15	10/08/15	5	canino Rebeca	swab anal	---	N	N	N
LRP0114/15	10/08/15	5	Canino Spike	soro	NR < 1:64	N	N	N
LRP0115/15	10/08/15	5	Canino Spike	coágulo	---	---	---	---
LRP0116/15	10/08/15	5	Canino Spike	swab anal	---	N	N	N
LRP0117/15	10/08/15	3	Canina Xuxa	soro	NR < 1:64	---	---	---
LRP0118/15	10/08/15	3	Canina Xuxa	coágulo	---	---	---	---
LRP0119/15	10/08/15	3	Canina Xuxa	sg EDTA	---	N	N	N
LRP0120/15	10/08/15	3	Canina Xuxa	Swab vaginal	---	N	N	N
LRP0121/15	10/08/15	3	Canina Xuxa	swab anal	---	N	N	N
LRP0125/15	25/09/15	3	Canino Xery	soro	NR < 1:64	---	---	---
LRP0126/15	25/09/15	3	Canino Xery	coágulo	---	---	---	---
LRP0127/15	25/09/15	3	Canino Xery	sangue EDTA	---	N	N	N
LRP0128/15	25/09/15	3	Canino Xery	plasma	---	---	---	---
LRP0129/15	25/09/15	3	Canino Xery	swab vaginal	---	N	N	N
LRP0130/15	25/09/15	3	Canino Xery	swab anal	---	N	N	N
LRP0131/15	25/09/15	3	Canino Polêmico	soro	R=128	---	---	---
LRP0132/15	25/09/15	3	Canino Polêmico	coágulo	---	---	---	---
LRP0133/15	25/09/15	3	Canino Polêmico	sangue EDTA	---	N	N	N
LRP0134/15	25/09/15	3	Canino Polêmico	plasma	---	---	---	---
LRP0135/15	25/09/15	3	Canino Polêmico	swab anal	---	N	N	N
LRP0136/15	25/09/15	3	Canino Peterson	soro	R=64	---	---	---
LRP0137/15	25/09/15	3	Canino Peterson	coágulo	---	---	---	---
LRP0138/15	25/09/15	3	Canino Peterson	sangue EDTA	---	N	N	N
LRP0139/15	25/09/15	3	Canino Peterson	plasma	---	---	---	---
LRP0140/15	25/09/15	3	Canino Peterson	swab anal	---	N	N	N

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

Tabela 5.10: Amostras PCR positivas para *Coxiella burnetii* e as sequenciadas com os respectivos números de acesso ao GenBank, procedentes de animais e dos respectivos artrópodes do município de Itaboraí/RJ

Numero de registro	Área	Animal/ taxonomia carrapato	Hospedeiro	Data de coleta	Gênero	Material	Numero de acesso ao GenBank
C50	3	<i>R.sanguineus</i>	Cão Kira	30/01/15	♂	carrapato	NS
C56	3	<i>R.sanguineus</i>	Cão Polêmico	30/01/15	♂	carrapato	NS
C59	3	<i>R.sanguineus</i>	Cão Polêmico	30/01/15	♂	carrapato	KT867378
C79	3	<i>R.sanguineus</i>	Cão 4 Xuxa	30/01/15	♀	carrapato	NS
C83	3	<i>R.sanguineus</i>	Cão 4 Xuxa	30/01/15	♀	carrapato	NS
C89	3	<i>R.sanguineus</i>	Cão 4 Xuxa	30/01/15	♂	carrapato	NS
C133	5C	<i>R.sanguineus</i>	Cão 1	30/01/15	♂	carrapato	NS
C154	5C	<i>A. sculptum</i>	Equino 2	30/01/15	♀	carrapato	KT970067
C414	3	<i>R.sanguineus</i>	Cão Xery	25/09/15	ninfa	carrapato	KU058956
LRP0074/15	3	Cão polêmico	----	25/03/15	♂	sang. EDTA	KT867377

NS: Positiva, mas não sequenciada.

As amostras positivas de carrapatos foram submetidas subsequentemente à detecção de outro gene que codifica uma proteína da membrana externa de 27 kDa da *C. burnetii*, comprovando que os resultados eram positivos para *C. burnetii* (Figura 5.7).

#### 5.4. População de Animais Domésticos

Nesta etapa do projeto, realizado na propriedade do caso índice ocorrido em 2008, os resultados sorológicos da primeira coleta, realizada em 2011, mostraram que três dos seis felinos e um dos três cães tinham anticorpos anti-*C. burnetii*. Todas as nove ovelhas foram não reativas.

Em relação ao estudo realizado em 2012, dois dos seis ovinos submetidos a nova coleta foram reativos e nenhum dos sete filhotes de gatos apresentou anticorpos anti-*C. burnetii*. Quanto aos resultados da análise molecular, foi possível recuperar o genoma da proteobactéria em um swab anal de um filhote de gato e em uma amostra de tecido do úbere da ovelha reativa que apresentou um aborto na ocasião (Tabela 5.11) (Figura 5.8.). Dos artrópodes, nenhuma dos 21 pulgas coletadas dos filhotes felinos apresentou o genoma da proteobactéria.

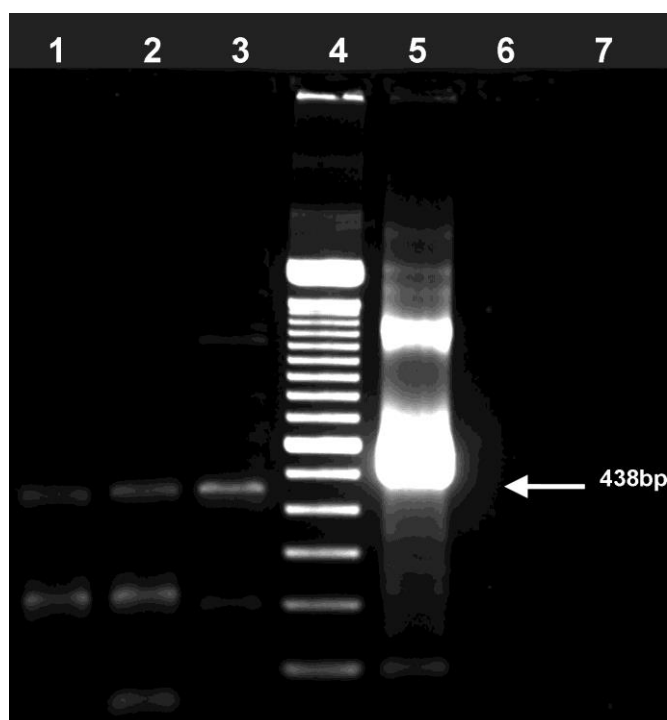


Figura 5.7: Gel de eletroforese de resultado da *Nested* PCR de gene que codifica uma proteína da membrana externa de 27 kDa da *C. burnetii com1* para DNA de artrópodes positivos. Linhas: 1 - DNA de carrapato 50; 2 - DNA de carrapato 56; 3 - DNA de carrapato 59; 4 - 100 bp DNA ladder; 5 - controle positivo; 6 - controle negativo da PCR1; 7 - controle negativo da PCR2.

A sequência obtida do swab anal do felino foi depositada no GenBank (GenBank No. KC854155) como também a do tecido do úbere da ovelha (GenBank No. KC854154) exibindo alta similaridade (99%) com outras sequências de *C. burnetii* no GenBank.

Tabela 5.11. Resultados obtidos pelos testes de imunofluorescência indireta (IFI) e moleculares (PCR) dos animais domésticos, na área do caso index de febre Q, no município de Itaboraí/RJ, em 2011 e 2012.

	IFA*		PCR		No de acesso GenBank
	2011 No de reativos (total)	2012 No de reativos (total)	2011 No de positivos (total)	2012 No de positivos (total)	
Ovelhas	0(9)	2(6)	0(9)**	1****(6)**	KC854154
Felinos adultos	3(6)	-----	0(6)**	-----	
Cães	1(13)	-----	-----	-----	
Felinos filhotes	-----	0(7)	-----	1***(7)**	KC854155
Pulgas	-----	-----	-----	0(21)	

\* IFI realizado no soro \*\*PCR realizada em soro ou coágulo; \*\*\*PCR realizada em swabs,\*\*\*\* PCR realizada em tecido.



Figura 5.8: Coleta de amostras de ovelha e gato positivos na propriedade de ocorrência do caso índice de febre Q: A - coleta de sangue de ovelha PCR positiva; B - coleta de swab anal de felino PCR positivo; C - coleta de pulgas; D - coleta de sangue de felino; E, gatil feito pelos proprietários depois de serem informados sobre os riscos de infecção de animais errantes.

## 5.5. População de Animais Silvestres

Em três expedições realizadas entre outubro de 2011 a setembro de 2012, nas três áreas do município de Itaboraí (Figura 4.2), foram capturados 59 pequenos mamíferos não voadores, animais de pequeno porte com até 5 kg (Rodentia e Didelphimorphia), com predomínio dos marsupiais (48 Didelphimorpha) e 11 pequenos roedores (Rodentia) (Tabela 5.12). Todos os animais foram testados para PCR, utilizando fragmento de tecido do baço e todas as amostras resultaram negativas.

Tabela 5.12. Pequenos mamíferos capturados no Município de Itaboraí, Rio de Janeiro, em três expedições realizadas entre outubro de 2011 a setembro de 2012.

Expedição*	Localidade**	Espécies (n)	Fêmea	Macho
I*	Área 1	<i>Didelphis aurita</i> (3)	2 (1 **)	1 (1**)
	Área 2	<i>Philander frenatus</i> (4)	-	4
		<i>Micoureus paraguayanus</i> (2)	1	1
Área 3	<i>Philander frenatus</i> (2)	-	2	
	<i>Akodon cursor</i> (4)	2	2	
	<i>Oligoryzomys nigripes</i> (1)	1	-	
	<i>Didelphis aurita</i> (1)	1	-	
II*	Área 1	<i>Didelphis aurita</i> (4)	4	-
	Área 2	<i>Philander frenatus</i> (10)	2	8 (4*)
		<i>Micoureus paraguayanus</i> (3)	1	2
Área 3	<i>Philander frenatus</i> (2)	2 (1 *)	-	
	<i>Akodon cursor</i> (1)	1	-	
III*	Área 1	<i>Didelphis aurita</i> (1)	1	-
	Área 2	<i>Akodon cursor</i> (1)	1	-
		<i>Micoureus paraguayanus</i> (5)	2	3
		<i>Philander frenatus</i> (5)	3	2
	Área 3	<i>Akodon cursor</i> (4)	2	2
		<i>Micoureus paraguayanus</i> (2)	1	1
<i>Philander frenatus</i> (4)		3	1	
	<i>Nectomys squamipes</i> (1)	-	1	

\* Expedição I de 10 a 14 de outubro de 2011; Expedição II, de 28 de maio a 01 de junho de 2012 e Expedição III, de 10 a 14 de setembro de 2012

\*\*Número de animais jovens

## 5.6. Atividades Realizadas em Resposta aos Resultados Obtidos

### 5.6.1. Tratamento e Medidas de Prevenção

Além de orientação quanto ao tratamento dos casos de febre Q, com a identificação de carrapato positivo em um cão com coxielose apresentando manifestação clínica foi instituída a antibioticoterapia neste animal com doxiciclina (100mg) BID por 15 dias na dosagem de 10mg/kg. Concomitantemente com a identificação de uma fêmea canina prenha do animal confirmadamente

infectado por *C. burnetii*, considerando que este agente pode ser transmitido pelo sêmen, amostras de sangue, swab vaginal e anal foram coletadas para prevenção de um possível aborto e manutenção da bactéria no ambiente. Os resultados das amostras da fêmea foram negativos e ela teve a ninhada sem problemas.

### **5.6.2. Material de Apoio tanto Epidemiológico como de Informação Epidemiológica**

Diante do contexto, foi elaborada uma ficha epidemiológica com o objetivo de auxiliar na vigilância realizada pelo profissional de saúde ao seu paciente no município de Itaboraí, considerando o diagnóstico diferencial da febre Q com outras doenças febris geralmente de maior frequência como a dengue (ANEXO 3).

Em adição, foi elaborado também um folder para auxiliar na divulgação e educação principalmente durante as visitas domiciliares e trabalho de campo. O material com informações sucintas mais importantes para o conhecimento tanto da doença como seu ciclo além das orientações básicas de como se proteger foram disponibilizadas assim como os telefones de contato para aconselhamento futuro, caso necessário (ANEXO 4).



## 6. DISCUSSÃO

Neste estudo pioneiro foi possível obter informações de grande importância tanto para a saúde pública quanto para a saúde animal, considerando a complexidade do ciclo desta zoonose cuja similaridade clínica com diversas doenças, em especial, influenza e dengue, associada com o desconhecimento por parte dos profissionais de saúde e da escassez de insumos para o seu diagnóstico permitem classificar a febre Q como doença negligenciada no território brasileiro.

De uma forma geral, a pesquisa teve como objetivo identificar a presença de febre Q e coxielose, nas amostras humanas e nas amostras dos animais vertebrados e seus ectoparasitas no município de Itaboraí, onde o primeiro caso de febre Q confirmado, por métodos moleculares, foi identificado no Brasil. Contando com a colaboração de profissionais para o estudo taxonômico dos animais vertebrados e dos ectoparasitas, a presente pesquisa fornece informações inéditas que serão apresentadas por tópicos, visando maior compreensão do leitor. Dados parciais, especialmente os relativos à vigilância de febre Q em amostras de casos suspeitos de dengue, também se encontram em artigo intitulado “Molecular identification of Q fever in Patients with a Suspected Diagnosis of Dengue in Brazil in 2013-2014” recentemente aceito para publicação, na revista *American Journal Tropical Medicine Hygiene*.

### 6.1. FEBRE Q E O DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL COM DENGUE

Embora a infecção por *C. burnetii* em seres humanos seja geralmente assintomática ou possa se manifestar como uma doença leve com recuperação espontânea, casos clínicos semelhantes aos da gripe caracterizada por um início súbito, febre alta, chegando a 40 °C, cefaleia intensa, perda de peso, mialgia e tosse, além de hepatite, em alguns casos com complicações graves e até morte podem ocorrer (Angelakis & Raoult, 2010). Além do quadro infeccioso agudo podem ser observados também casos de infecção crônica com desfecho fatal, especialmente em pacientes com meningoencefalite ou miocardite e, mais frequentemente, em pacientes cronicamente infectados com endocardite. Pacientes com risco de febre Q crônica incluem pessoas com anormalidades cardiovasculares e, em menor frequência, em imunocomprometidos e gestantes (Maurin, Raoult, 1999; Arricau-Bouvery, Rodolakis, 2005).

Este estudo teve como objetivo principal fazer vigilância de casos febris agudos causados por *C. burnetii* que pudessem estar sendo confundidos com dengue, considerando não somente a ocorrência de surto desta arbovirose durante o período de estudo, mas também

a informação de que os animais da propriedade do caso índice de febre Q tinham sido vendidos e transferidos aleatoriamente para outras regiões do município de Itaboraí.

No Brasil, aproximadamente 2 milhões e 587,800 casos de dengue foram registrados em 2013 e em 2014, respectivamente. Uma das áreas mais afetadas foi a do estado do Rio de Janeiro, onde foram registrados mais de 220.000 casos de dengue durante este período, resultante do vírus da dengue (DENV 1) (Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde - Brasil. 2014.).

No município de Itaboraí, onde foi realizada a vigilância, 5.881 e 376 casos de dengue foram registrados em 2013 e 2014 respectivamente. O número relativamente baixo de casos de dengue registrados em 2014 explica o número pequeno de casos incluídos no ano de 2014.

Quanto à análise laboratorial, somente pacientes cujas amostras de sangue foram PCR-positivas, tiveram diagnóstico definitivo de febre Q devido à impossibilidade de se realizar o diagnóstico sorológico confirmatório baseado na seroconversão com duas amostras coletadas, uma na fase inicial e outra, na fase de convalescência (Angelakis & Raoult, 2010). Assim, embora o teste sorológico seja a abordagem mais frequentemente utilizada para confirmar febre Q, como as análises laboratoriais dos casos suspeitos de dengue rotineiramente ocorrem nos primeiros cinco dias de doença, não foi possível obter uma segunda amostra de sangue (Martins et al, 2014).

Neste contexto, considerando que o teste sorológico como instrumento diagnóstico da febre Q não seria viável, os pacientes atendidos no hospital foram submetidos a um inquérito sorológico visando à detecção de anticorpos anti-*C. burnetii* da classe IgG. A análise demonstrou que 26 (10%) dos pacientes foram reativos para *C. burnetii*. Estudos realizados na Croácia com pacientes febris mostrou uma prevalência de 27,5% para *C. burnetii* (Vilibic-Cavlek et al, 2012). Resultados similares foram encontrados na França, onde um total de 179.794 amostras de sangue de pacientes com suspeita de febre Q foram testadas, entre o período de janeiro de 1985 a dezembro de 2009, e 39.472 (30%) apresentaram anticorpos anti-*C. burnetii* em uma triagem com titulação de 100. No entanto, é preciso considerar que o diagnóstico da forma aguda em 732 pacientes foi com base em uma titulação maior do que 200 (IgG antígeno fase II) e na forma crônica, em 1675 pacientes, com título de anticorpos da classe IgG anti-*C. burnetii* fase I maior que 800. Justifica-se este ponto de corte mais elevado por ser a França um país com áreas sabidamente endêmicas para febre Q (Frankel et al, 2011).

Estudos realizados nos EUA, Turquia, Tailândia, Espanha, Grécia mostraram respectivamente 3,1%, 7,8%, 4,2%, 15,3%, 7,5% de prevalência na população geral (Anderson et al, 2009; Cetinkaya et al, 2000; Ko et al, 2000; Cardeñosa et al, 2006; Pape et al., 2009). No Brasil, um estudo desenvolvido em indivíduos HIV-sororreativos, no município

do Rio de Janeiro, os autores identificaram presença de anticorpos anti-*C. burnetii* em 3,2% e somente um participante do estudo revelava história de contato com material de parto de animais (Lamas et al., 2009).

Quanto aos resultados obtidos pela análise molecular, foi possível confirmar nove (3,3%) casos de febre Q. Embora com base na análise sorológica, resultados semelhantes foram obtidos em estudos, conduzidos na Tanzânia, onde 5% dos pacientes hospitalizados apresentaram anticorpos séricos contra *C. burnetii* (Prabhu et al., 2011). Na Georgia, num estudo sobre diagnóstico diferencial em casos febris, 2% dos casos foram confirmados sorologicamente como febre Q (Kuchuloria et al, 2015). Poucos estudos de vigilância febril aguda de desenho prospectivo com base em análise molecular têm sido realizados (Vincent et al., 2015; Alonso et al., 2015). Recentemente, no Brasil, foi publicado uma série de casos de endocardite hemocultura-negativa cuja análise molecular e imunohistoquímica confirmaram quatro casos de febre Q (Siciliano et al 2015) reforçando a necessidade de inclusão da febre Q no diagnóstico diferencial de doenças infecciosas febris, não somente aguda como a dengue e as pneumonias, mas também nas doenças subagudas e crônicas.

Dos 272 pacientes avaliados, 61,3% foram confirmados infectados com o vírus da dengue. A faixa etária mais comum com a infecção foi a de 31-40 anos de idade. Febre, dor de cabeça, prostração, petéquias e dor retro-orbital foram frequentemente observadas em pacientes com infecção por dengue, consistente com estudos anteriores (Daumas et al, 2013; Martins et al, 2014).

Sete dos nove pacientes com febre Q tiveram febre e cefaléia, manifestações mais comuns tanto nos casos de dengue quanto nos da febre Q (Anderson et al, 2013). A mialgia apareceu comum tanto nos casos de dengue, como de febre Q e de dengue negativos. Assim, considerando que as manifestações clínicas destas doenças infecciosas possam ser semelhantes, o diagnóstico clínico preciso se torna difícil, sem a confirmação laboratorial, especialmente durante a epidemia de dengue, fato que pode confundir muito o profissional de saúde que não conheça e não inclua a febre Q no diagnóstico diferencial.

Evidência de coinfeção entre o vírus da dengue e *C. burnetii* foi observado em apenas um dos 272 pacientes. Este resultado é inédito, nunca descrito na literatura, embora exista relato de infecção concomitante de microorganismos típicos (*Streptococcus* e *Enterococcus*) com *C. burnetii* em pacientes com endocardite infecciosa (Roverly et al, 2009), assim como evidência sorológica de co-infecção de *C. burnetii* com agentes transmitidos por carrapatos, como *Rickettsia conorii*, *Rickettsia slovaca* e *Francisella tularensis* (Rolain et al, 2005). É possível que, durante epidemias de dengue, considerando o grande número de pessoas potencialmente expostas ao risco de infecção por *C. burnetii*, que esta coinfeção possa ser

muito maior do que o esperado em especial em áreas onde a presença de *C. burnetii* já tenha sido confirmada.

Considerando as informações disponíveis na literatura, é pertinente considerar a capacidade de dispersão dos aerossóis de *C. burnetii* que podem chegar a uma distância de 2 km a partir do foco (Nusinovici et al., 2015), fato que reforça os resultados obtidos neste estudo, no qual a maioria dos casos de febre Q ocorreu dentro de uma distância entre 2 a 5 km em relação à propriedade do caso índice relatado em 2008 (Lemos et al., 2011).

Por fim, estes resultados ilustram também a grande dificuldade de abordagem de pacientes em uma área endêmica de dengue ou de qualquer outra doença infecciosa febril com sinais e sintomas inespecíficos e semelhantes aos da febre Q. Os nove pacientes foram atendidos no hospital como dengue e, embora a ocorrência de febre Q tenha sido previamente alertada no município, os profissionais médicos não consideraram esta zoonose no diagnóstico diferencial, confirmando o conceito de febre Q como doença negligenciada e reforçando a necessidade de sensibilização dos profissionais de saúde sobre a sua ocorrência não somente no estado do Rio de Janeiro, mas em todo território brasileiro.

## **6.2. ESTUDO NAS ÁREAS DE OCORRÊNCIA DE CASOS DE FEBRE Q**

Neste estudo foram analisadas amostras de soro de dois dos nove casos confirmados de febre Q, dois anos depois, e o resultado foi compatível com a cinética de anticorpos observada na febre Q aguda autolimitada, na ausência de reexposição, considerando que a persistência de anticorpos anti-*C. burnetii*, em elevados títulos, que pode ocorrer em 1 a 5% dos casos, aponta para a possibilidade de febre Q crônica (Maurin e Raoult, 1999).

Segundo Fournier e colaboradores, em uma extensa revisão sobre febre Q publicada em 1998, os maiores títulos de anticorpos anti-*C. burnetii*, utilizando o teste de imunofluorescência, são detectados na quarta a oitava semana do início do quadro clínico na febre Q aguda, com queda gradativa, na ausência de reexposição, no prazo de 12 meses (Fournier et al 1998).

Embora não tivessem discutido a presença ou não de exposição frequente, Dupuis e colaboradores acompanharam 191 pacientes com febre Q e observaram que, um ano após o início da doença, os títulos variaram de 20 a 640 (Dupuis et al., 1985). É pertinente registrar que o título de corte utilizado no presente estudo foi considerado a partir da diluição de 1:64 e que os pacientes, dois anos depois do início da doença, não apresentavam qualquer manifestação clínica.

Os fatores que justifiquem a falta ou a detecção continuada de anticorpos anti-*C. burnetii* (título > 64) ainda não muito claros, mas a exposição continuada e os fatores relacionados ao

hospedeiro precisam ser considerados. Marmion e colaboradores sugerem que a persistência de anticorpos poderia também ser decorrente da manutenção de organismos na medula óssea (Marmion et al., 2005).

Embora o enfoque tenha sido o risco de se desenvolver a forma crônica, um estudo com pacientes com febre Q aguda com alto risco de desenvolvimento da forma crônica foi realizado, durante o surto de febre Q na Holanda, e níveis de anticorpos foram identificados por 4 anos, após a infecção aguda. Possivelmente esta persistência de anticorpos séricos seja decorrente de reexposição continuada (Jajou et al., 2014).

Em adição, considerando a análise sorológica utilizando a técnica ELISA, Waag e colaboradores (1995) conseguiram detectar anticorpos específicos por mais de 5 anos após o episódio agudo. No entanto, é preciso considerar que, embora muitas técnicas sorológicas venham sendo utilizadas, a imunofluorescência indireta é o método de referência por sua sensibilidade e especificidade. Em outra publicação, também na década de 1990, os autores tentaram correlacionar a evolução da febre Q aguda com a razão IgG/IgM, mas os resultados foram imprecisos para serem considerados (Guigno et al, 1992).

Mais recentemente, Wielders e colaboradores (2012), em um estudo conduzido na Holanda, identificaram casos de febre Q aguda cujos anticorpos IgG de fase I foram produzidos apenas por um curto período de tempo e, portanto, não foram detectados nas 3, 6 e 12 meses de segmento. Em adição, neste mesmo estudo, em dois destes pacientes com febre Q aguda PCR-comprovada, foi possível identificar a ausência de anticorpos IgG de fase I durante todo acompanhamento ambulatorial.

Neste cenário, considerando também que nenhum contactante apresentou evidência sorológica de infecção por *C. burnetii*, fica clara a necessidade do desenvolvimento de estudos de soroprevalência assim como pesquisas sobre a cinética de anticorpos dos casos confirmados, com adequada interpretação devido à possibilidade de reexposição.

Com relação à investigação de artrópodes nas áreas onde pacientes com febre Q foram confirmados, foi possível identificar outros focos de infecção no município. Os resultados obtidos da análise dos 283 artrópodes, coletados nas áreas mais distantes do foco inicial, permitem sugerir a existência de novos focos, não podendo, no entanto, descartar a possibilidade da propagação do foco inicial para outras localidades, considerando que cabras positivas da propriedade do caso index foram vendidas e transferidas para outras áreas do município. Infelizmente, apesar de todos os esforços, tanto da equipe do Laboratório de Hantaviruses e Rickettsioses quanto da Secretaria Municipal de Saúde de Itaboraí, não foi possível rastrear e recuperar os animais assim como as áreas para as quais estes animais foram vendidos. É preciso registrar que cabras da raça Saanen (aptidão leiteira), similares às que

existiam na propriedade do caso index, circulavam livremente nas ruas da área 3. Como as cabras infectadas, foram posteriormente vendidas, a hipótese de que novos focos tenham sido estabelecidos a partir destes animais não pode ser descartada.

Ainda na área 3, a detecção de um cão PCR-positivo e não reativo que, três meses depois soroconverteu, reforça a hipótese acima que associada com identificação de carrapatos PCR positivos que também foram coletados no mesmo cão, servem mais uma vez de alerta para o papel destes ectoparasitas na manutenção da infecção nos animais.

Não obstante a presença de carrapatos infectados perpetuando o ciclo do agente, a possibilidade de excreção de *C. burnetii* no ambiente, podendo contaminar seres humanos, é outra possibilidade de manutenção bacteriana no ambiente que não deve ser desconsiderada. É imprescindível comentar que, embora carrapatos infectados com *C. burnetii* já tenham sido identificados em vários trabalhos no exterior (Kumsa et al, 2015; Cooper et al, 2013; Sprong et al, 2012; Toledo et al, 2009), este o primeiro relato da presença de *C. burnetii* em artrópodes no Brasil.

Na propriedade de um dos pacientes com febre Q, identificados em 2013, a partir da identificação de carrapato positivo coletado em um cão PCR positivo que soroconverteu, foi instituída antibioticoterapia neste animal com doxiciclina na dosagem de 10mg/kg durante 15 dias. Diante da informação de que uma fêmea estava prenhe do canino positivo e levando em consideração também que *C. burnetii* pode ser transmitida pelo sêmen, amostras de sangue, além de swab anal e vaginal foram coletadas e os resultados dos testes não identificaram infecção e o animal teve seus filhotes sem problemas.

### **6.3. POPULAÇÃO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS**

Nesta etapa do estudo, realizada na propriedade do caso de febre Q confirmado em 2008 (Lemos et al 2011), foi possível detectar o DNA de *C. burnetii* em animais domésticos, confirmando uma das características mais relevantes deste microorganismo, que é a sua capacidade de persistência no meio ambiente com a manutenção de sua capacidade infectante (Maurin, Raoult, 1999; Angelakis & Raoult, 2010; Kersh et al, 2013). Neste estudo a capacidade de persistência bacteriana no ambiente foi comprovada a partir da detecção do genoma parcial da *C. burnetii* não somente nas ovelhas introduzidas no local, mas também em um felino de companhia dos proprietários.

Embora a infecção por *C. burnetii* não tenha sido identificada em nenhuma pulga coletada dos felinos da propriedade do paciente, faz-se necessário verificar a participação de outros invertebrados no complexo ciclo da vida desta bactéria, que utiliza diversas estratégias de sobrevivência no meio externo. O agente da febre Q tem a capacidade de ser excretado no

leite, nas fezes, de se encontrar em grande concentração nas placentas ou em outros materiais biológicos e de se perpetuar no ambiente com a participação de diversas espécies de vertebrados e de artrópodes, especialmente, dos carrapatos (Angelakis & Raoult, 2010).

Com a resolução das autoridades de, finalmente, tornar a febre Q uma doença de notificação obrigatória no Brasil desde 2014, os resultados obtidos neste estudo inédito poderão auxiliar a vigilância do sistema de saúde local e quiçá no Brasil, onde escassas informações sobre esta zoonose se encontram disponíveis. Com o recente desmatamento e ocupação de vastas áreas do município de Itaboraí para a implantação do Complexo Petroquímico da Petrobrás associados com a migração de população de diferentes regiões do Brasil, a necessidade de dar continuidade ao desenvolvimento desse estudo precisa ser enfatizada.

#### **6.4. POPULAÇÃO DE ANIMAIS SILVESTRES**

Diante da hipótese de que a infecção por *C. burnetii* estivesse sendo mantida no ambiente com a participação também de animais silvestres, foi realizado um estudo no qual, apesar do pequeno número de animais analisados, os resultados obtidos demonstram que, pelo menos até a data da coleta, não há evidência de circulação do agente da febre Q em animais silvestres na região de estudo.

Existem poucos estudos sobre animais silvestres e infecção por *C. burnetii*, embora estes animais tenham um papel importante como reservatórios para animais de produção (Angelakis & Raoult, 2010). Neste contexto, roedores silvestres de pequeno porte têm sido considerados importantes reservatórios de *C. burnetii*, podendo estar implicados na transmissão de *C. burnetii* a animais, mas não ao homem (Raoult & Marrie, 1995, Angelakis & Raoult, 2010).

Neste estudo, diante da ausência de animais silvestres infectados com *C. burnetii*, em associação com a informação de cães, ovelhas e cabras comprovadamente infectados, tanto por técnica sorológica quanto molecular, é possível especular que a presença da bactéria na propriedade foi consequente à introdução do lote de cabras comprado pelo proprietário. A partir desta observação, considerando, assim, que a bactéria foi introduzida, faz-se necessário obter mais informações para que se possa rastrear a procedência, visando não apenas às medidas de prevenção no contexto da saúde pública, mas também em relação à saúde animal, já que, não raramente, casos de abortos repetidos em animais ruminantes são frequentemente diagnosticados, apenas com base clínica, como brucelose. Apesar de todos os esforços da equipe, com apoio da secretaria municipal de saúde de Itaboraí, não foi possível identificar o

destino dos animais, pois no momento da investigação a febre Q não se encontrava na lista das doenças de notificação compulsória.

### **6.5. A IMPLANTAÇÃO DA NESTED PCR**

Por fim, alguns comentários são apresentados sobre o processo de implantação da *Nested* PCR, considerando que algumas amostras só foram positivas e sequenciadas com esta variante da PCR.

A PCR tem sido amplamente utilizada para o diagnóstico de doenças infecciosas, incluindo as causadas por *C. burnetti*. Sabe-se que o *hemi-Nested* e o *Nested* PCR, que utilizam iniciadores internos, aumentam a sensibilidade e conduzem, pelo menos, a um aumento de 10.000 vezes o número de produto de PCR. Com a expectativa de se obter um teste diagnóstico mais robusto, reduzindo a possibilidade de resultado falso negativo, todas as amostras foram testadas com iniciadores internos, independentemente do primeiro resultado da PCR ter sido negativo. Estudos têm demonstrado que os resultados falsos negativos, depois da primeira PCR, podem ocorrer devido a um número muito pequeno de cópias presentes na amostra (Watzinger et al., 2006; Klein, 2002). Assim, uma *Nested* PCR foi desenvolvida pela equipe do LHR, utilizando novos *primers* internos, referentes aos *primers* Trans-PCR (Berri et al., 2000, Willems et al., 1994; Houver et al., 1992), processo que aumentou a sensibilidade em 10x gerando uma sequência parcial com excelente tamanho de 440bp.

Embora várias técnicas de PCR em tempo real sejam comprovadamente sensíveis para o diagnóstico imediato e esta técnica vem cada vez mais sendo utilizada (Angelakis & Raoult, 2010; Klee et al., 2006), este estudo teve como objetivo encontrar uma alternativa para PCR convencional, visando à detecção de *C. burnetii* não somente em amostras de soro, conforme proposta de Chen et al (2014), mas também em amostras de leite, swabs e tecidos. Desta forma, diante dos resultados obtidos, considerando além do tamanho de 440bp, a possibilidade de amplificar e sequenciar segmentos parciais que certamente não se alinham com outros microorganismos, fez deste par de *primers* uma ótima alternativa para o qPCR. Em nossos experimentos, foi possível a amplificação do genoma bacteriano em diferentes amostras, procedentes de variados hospedeiros em diversos materiais biológicos.

Considerando que atualmente o padrão ouro para definição de caso confirmado de febre Q é com base na soroconversão utilizando o teste de imunofluorescência, os resultados obtidos neste estudo demonstram que a detecção de amostras positivas com a consequentemente confirmação do diagnóstico de febre Q deve ser utilizada a técnica de PCR, com aumento da detecção com a *Nested* PCR.



Por fim, considerando que IS1111 não seja considerada específica para *C. burnetii* e que os ensaios de detecção de febre Q com base apenas neste elemento pode conduzir a erros de identificação com endosimbiontes *Coxiella-like* presentes em carrapatos (Duron, 2015), as amostras destes artrópodes que foram IS1111 positivos também foram submetidas subsequentemente à detecção de outro gene que codifica uma proteína da membrana externa de 27 kDa da bactéria, comprovando que os resultados, de forma inquestionável, eram específicos para *C. burnetii*.

#### **6.6. ATIVIDADES REALIZADAS EM RESPOSTA AOS RESULTADOS OBTIDOS**

A partir dos resultados sequencial e gradativamente obtidos, foram desenvolvidas atividades que, não somente auxiliaram no desenvolvimento do presente trabalho, mas que também contribuíram para a sensibilização dos profissionais de saúde e para a inclusão da febre Q como doença de notificação no Brasil. Assim, além de palestras e orientações presenciais, durante as atividades de campo, foram desenvolvidos materiais como uma ficha epidemiológica estruturada especificamente para febre Q (ANEXO 3), incluindo agravos outros no contexto do diagnóstico diferencial e um folder explicativo (ANEXO 4) visando à obtenção de um conhecimento melhor sobre a doença, possibilitando a divulgação sobre a forma de manutenção do agente no ambiente e as medidas de prevenção.

## 7. CONCLUSÕES

7.1. A presença de infecção por *C. burnetti* em pacientes com suspeita de dengue atendidos no Hospital Municipal Desembargador Leal Junior reforça a importância de se levar em consideração a existência de disseminação do agente na região e da necessidade da inclusão da febre Q no diagnóstico diferencial de doenças febris agudas.

7.2. Com a implantação da *Nested* PCR, utilizando *primers*, especificamente desenhados pela equipe do LHR a partir do *primer* utilizado nos protocolos previamente estabelecidos, foi possível identificar um maior número de casos de febre Q.

7.3. A análise filogenética das sequências nucleotídicas parciais amplificadas a partir diferentes amostras biológicas demonstrou elevada similaridade entre si e com as sequências depositadas no GenBank, confirmando que *C. burnetii* foi a responsável por nove casos inicialmente suspeitos de dengue e pelo abortamento dos animais domésticos na área de estudo.

7.4. Os dados clínicos e epidemiológicos dos casos confirmados de febre Q foram semelhantes aos observados nos casos de dengue e aos sem etiologia definida, apontando para a dificuldade diagnóstica e para a necessidade de testes laboratoriais específicos com objetivo de esclarecer os casos febris agudos, especialmente durante o período de surto de dengue, quando casos são confirmados apenas com base clínica-epidemiológica.

7.5. A sororreatividade identificada nas amostras de soro de casos humanos suspeitos de dengue internados no Hospital Municipal Desembargador Leal Junior sugerem a presença de *C. burnetii* no município e indicam a necessidade de mais estudos.

7.6. Embora o teste sorológico seja considerado a técnica mais frequentemente utilizada na rotina, não foi um instrumento laboratorial adequado para o diagnóstico precoce da febre Q e que há necessidade de mais estudos que possam dar informação sobre a prevalência de anticorpos anti-*C. burnetii* na população brasileira, visando, entre outros pontos, a verificação do ponto de corte ideal.

7.7. A presença de ovelhas introduzidas no local e em três dos felinos sororreativos confirma a presença de *C. burnetii* entre animais domésticos com a sua persistência no ambiente da propriedade do caso índice.

7.8. A identificação do genoma de *C. burnetii*, através da PCR em amostras de tecido do úbere de uma ovelha e em *swab* anal de um felino na propriedade do paciente comprova a persistência bacteriana no ambiente.

7.9. A identificação de artrópodes infectados em diferentes focos na região, assim como de animais domésticos comprovadamente infectados, demonstra a complexidade do ciclo e a necessidade de maior atenção por parte dos profissionais da saúde pública e da saúde animal quanto à capacidade de identificação e de instituição de medidas de prevenção desta doença.

7.10 É possível que o número de casos de febre Q nesta casuística possa ser maior devido à inviabilidade do diagnóstico sorológico confirmatório.

7.11. A partir dos resultados obtidos e de sua disponibilização para os serviços de saúde municipal, estadual e federal, é possível concluir também que, especialmente agora, que a doença passou a ser de notificação obrigatória pelo Ministério da Saúde, estes precisam ser alertados quanto à possibilidade de casos de febre Q equivocadamente diagnosticados como dengue ou como outra doença febril aguda no Brasil.

## 8. PERSPECTIVAS

8.1 A partir das informações obtidas neste estudo, a perspectiva é que a vigilância epidemiológica municipal e estadual, com o apoio do LHR, mantenham na vigilância da febre Q na região, considerando o grande número de pequenas propriedades com criação informal e de caráter familiar, de cabras de aptidão leiteira na região de estudo;

8.2. Revisar o artigo científico intitulado “Clinical and epidemiological use of *Nested* PCR targeting the repetitive element *IS1111* associated with the transposase gene from *Coxiella burnetii*” para que possa ser encaminhado para publicação no prazo de 60 dias;

8.3. Finalizar o artigo científico intitulado “Molecular and serological *Coxiella burnetii* identification in animals from an area of Q fever occurrence in Brazil” em fase de elaboração para que possa ser encaminhado para publicação no prazo de quatro meses;

8.4. Por fim, diante da impossibilidade de identificar o genótipo do agente bacteriano neste estudo, a proposta de implantar a técnica de análise genotípica através de MST (Multispacer Sequence Typing) possibilitará, com a detecção de polimorfismos em várias regiões do genoma (Drancourt et al., 2004), a caracterização dos isolados procedentes de diferentes fontes (humana, vertebrado e invertebrado) permitindo não somente a comparação dos resultados obtidos em laboratórios e regiões diferentes, mas também a identificação de diferentes cepas, assim como a sua associação com as diversas manifestações clínicas da febre Q e os diferentes hospedeiros envolvidos na manutenção do ciclo.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe T, Yamaki K, Hayakawa T, Fukuda H, Ito Y, Kume H, Komiya T, Ishihara K, Hirai K. 2001. A seroepidemiological study of the risks of Q fever infection in Japanese veterinarians. *Eur J Epidemiol.* 17(11):1029-32.
- Alonso E, Lopez-Etxaniz I, Hurtado A, Liendo P, Urbaneja F, Aspririxaga I, Olaizola JI, Piñero A, Arrazola I, Barandika JF, Hernáez S, Muniozguren N, García-Pérez AL. 2015. Q Fever Outbreak among Workers at a Waste-Sorting Plant. *PLoS One.* 10(9):e0138817. doi: 10.1371/journal.pone.0138817. eCollection 2015.
- Anderson AD, Baker TR, Littrell AC, Mott RL, Niebuhr DW, Smoak BL. 2011. Seroepidemiologic survey for *Coxiella burnetii* among hospitalized US troops deployed to Iraq. *Zoonoses Public Health.* 58(4):276-83. doi: 10.1111/j.1863-2378.2010.01347.x.
- Anderson AD, Kruszon-Moran D, Loftis AD, McQuillan G, Nicholson WL, Priestley RA, Candee AJ, Patterson NE, Massung RF. 2009. Seroprevalence of Q Fever in the United States, 2003–2004. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81(4), pp. 691–694
- Anderson A, Bijlmer H, Fournier PE, Graves S, Hartzell J, Kersh GJ, Limonard G, Marrie TJ, Massung RF, McQuiston JH, Nicholson WL, Paddock CD, Sexton DJ, 2013. Diagnosis and Management of Q Fever — United States, 2013 Recommendations from CDC and the Q Fever Working Group. *MMWR* ,Vol. 62, No. 3, pp 1-30. [Page last updated March 29, 2013]. Available at: <http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr6203.pdf>
- Angelakis E, Raoult D, 2011. Emergence of Q fever. *Iran J Public Health.* 40(3): 1–18.
- Angelakis E, Raoult D. 2010. Review Q fever. *Veterinary Microbiology.* 140: 297–309.
- Arricau-Bouvery N, Rodolakis A 2005. Is Q Fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Veterinary Research* 36: 327–349.
- Baca O.G. and Paretzky, D. Q fever and *Coxiella burnetii*: a model for host-parasite interaction. *Microbiol. 1983. Rev.* 47, 127–149.
- Bartolomé J, Riquelme E, Hernández-Pérez N, García-Ruiz S, Luján R, Lorente S, Medrano-Callejas R, Crespo MD. 2007. Seroepidemiology of *Coxiella burnetii* infection among blood donors in Albacete. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 25(6):382-6.
- Baud D, Peter O, Langel C, Regan L, Greub G. 2009. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* and *Brucella abortus* among pregnant women. *Clin Microbiol Infect.* 15(5):499-501. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02779.x.
- Berberoğlu U, Gözalan A, Kiliç S, Kurtoğlu D, Esen B. 2004. A seroprevalence study of *Coxiella burnetii* in Antalya, Diyarbakir and Samsun provinces *Mikrobiyol Bul.* 38(4):385-91.
- Bernard H, Brockmann SO, Kleinkauf N, Klinc C, Wagner-Wiening C, Stark K, Jansen A. 2012. High seroprevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in veterinarians associated with cattle obstetrics, Bavaria, 2009. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12(7):552-7. doi: 10.1089/vbz.2011.0879.
- Berri M, Laroucau K, Rodolakis A. 2000. The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology* 72: 285-293.
- Borges D. 1962. Serological evidence of Q fever in herders in Brazil. *Revista Paulista de Medicina,* 60, 424-432.

- Bosnjak E, Hvass AM, Villumsen S, Nielsen H. 2010. Emerging evidence for Q fever in humans in Denmark: role of contact with dairy cattle. *Clin Microbiol Infect.* 16(8):1285-8. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.03062.x.
- Brandão H, Valle L, Christóvão D. 1953. Investigações sobre a febre Q em São Paulo. 1. Estudo sorológico em operários de um frigorífico. *Arquivos da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo*, 7(1), 127-133.
- Buhariwalla F, Cann B, Marrie TJ 1996. A Dog-Related Outbreak of Q Fever. *Clinical Infectious Diseases* 39(4): 753-755.
- Carcopino X, Raoult D, Bretelle F et al. 2007. Managing Q fever during pregnancy the benefits of long-term cotrimoxazole therapy. *Clin Infect Dis* 45: 548–555
- Cardeñosa N, Sanfeliu I, Font B, Muñoz T, Nogueras MM, Segura F. 2006. Short report: seroprevalence of human infection by *Coxiella burnetii* in Barcelona (northeast of Spain). *Am J Trop Med Hyg.* 75(1):33-5.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Bioterrorism agents/diseases [Page last updated February 12, 2007]. Available at: <http://emergency.cdc.gov/agent/agentlist.asp>
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2015. Q fever. Access: <http://www.cdc.gov/qfever/symptoms/index.html>
- Centers for Disease Control and Prevention. Bioterrorism agents/diseases [cited 2006 Sep 9]. Available from <http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp#b>
- Cetinkaya B, Kalender H, Ertas HB, Muz A, Arslan N, Ongor H, Gurçay M. 2000. Seroprevalence of coxiellosis in cattle, sheep and people in the east of Turkey. *Vet Rec.* 146(5):131-6.
- Chang CC, Lin PS, Hou MY, Lin CC, Hung MN, Wu TM, Shu PY, Shih WY, Lin JH, Chen WC, Wu HS, Lin LJ. 2010. Identification of risk factors of *Coxiella burnetii* (Q fever) infection in veterinary-associated populations in southern Taiwan. *Zoonoses Public Health.* 57(7-8):e95-101. doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01290.x.
- Chen HW, Ching WM. Development of loop-mediated isothermal amplification assays for rapid and easy detection of *Coxiella burnetii* 2014. *Journal of Microbiological Methods* 107:176–181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2014.07.039>
- Cinco M, Luzzati R, Mascioli M, Floris R, Brouqui P. 2006. Serological evidence of *Rickettsia* infections in forestry rangers in north-eastern Italy. *Clin Microbiol Infect.* 12(5):493-5.
- Cooper A, Stephens J, Ketheesan N, Govan B. 2013. Detection of *Coxiella burnetii* DNA in Wildlife and Ticks in Northern Queensland, Australia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* Volume 13, Number 1, p12-16.
- Costa PSG, Brigatte ME, Greco DB. 2006. Questing one Brazilian query: reporting 16 cases of Q fever from Minas Gerais. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 48(1), pp. 5-9.
- Costa, PSG. 2005. Serologic evidences of *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae* and *Ehrlichia chaffeensis* infections in healthy individuals and febrile aids and non-AIDS patients from the region of Juiz de Fora, Minas Gerais. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* vol.47 no.4 São Paulo.
- Daumas RP, Passos SRL, Oliveira RVC, Nogueira RMR, Georg I, Marzochi KBF, Patrícia Brasil P, 2013. Clinical and laboratory features that discriminate dengue from other

- febrile illnesses: a diagnostic accuracy study in Rio de Janeiro, Brazil BMC Infect Dis. 13: 77.
- De Lange MM, Schimmer B, Vellema P, Hautvast JL, Schneeberger PM, Van Duijnhoven YT. 2014. *Coxiella burnetii* seroprevalence and risk factors in sheep farmers and farm residents in The Netherlands. Epidemiol Infect. 142(6):1231-44. doi: 10.1017/S0950268813001726.
- de Rooij MM, Schimmer B, Versteeg B, Schneeberger P, Berends BR, Heederik D, van der Hoek W, Wouters IM. 2012. Risk factors of *Coxiella burnetii* (Q fever) seropositivity in veterinary medicine students. PLoS One. 7(2):e32108. doi: 10.1371/journal.pone.0032108.
- Dolcé P, Bélanger MJ, Tumanowicz K, Gauthier CP, Jutras P, Massé R, Montpetit C, Bernatchez H, McColl D, Artsob H. 2003. *Coxiella burnetii* seroprevalence of shepherds and their flocks in the lower Saint-Lawrence River region of Quebec, Canada. Can J Infect Dis. 14(2):97-102.
- Dorko E, Kalinová Z, Pilipčinec E. 2008. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* antibodies among students of the Faculty of Medicine in Kosice (Slovakia). Folia Microbiol (Praha). 53(6):563-8. doi: 10.1007/s12223-008-0090-2.
- Dorko E, Kalinova Z, Weissova T, Pilipčinec E. 2008. Seroprevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* among employees of the Veterinary University in Kosice, eastern Slovakia. Ann Agric Environ Med. 15(1):119-24.
- Dorko E, Rimárová K, Kecerová A, Pilipčinec E, Dudříková E, Lovayová V, Petrovičová J, Boroš E. 2011. Potential association between *Coxiella burnetii* seroprevalence and selected risk factors among veterinary students in Slovakia. Ann Agric Environ Med. 18(1):47-53.
- Dupuis, G. Pete O, Peacock M, Burgdorfer W, Haller E. 1985. Immunoglobulin Responses in Acute Q Fever. Journal of Clinical Microbiology p. 484-487.
- Duron O. 2015. The IS1111 insertion sequence used for detection of *Coxiella burnetii* is widespread in *Coxiella*-like endosymbionts of ticks. FEMS Microbiol Lett. 362(17). pii: fnv132. doi: 10.1093/femsle/fnv132. Epub 2015 Aug 12.
- Duron O, Noël V, McCoy KD, Bonazzi M, Sidi-Boumedine K, Morel O, et al. 2015. The Recent Evolution of a Maternally-Inherited Endosymbiont of Ticks Led to the Emergence of the Q Fever Pathogen, *Coxiella burnetii*. PLoS Pathog 11(5):e1004892. doi:10.1371/journal.ppat.1004892
- Ergönül O, Zeller H, Kiliç S, Kutlu S, Kutlu M, Cavusoglu S, Esen B, Dokuzoğuz B. 2006. Zoonotic infections among veterinarians in Turkey: Crimean-Congo hemorrhagic fever and beyond. Int J Infect Dis. 10(6):465-9.
- Fournier PE, Marrie TJ, Raoult D. 1998. Minireview Diagnosis of Q Fever. Journal of Clinical Microbiology. 36: 1823–1834.
- Frankel D, Richet H, Renvoisé A, Raoult D. 2011. Q Fever in France, 1985–2009. Emerg Infect Dis. 17(3): 350–356.
- Georgiev M, Afonso A, Neubauer H, Needham H, Thiery R, Rodolakis A, Roest H, Stark K, Stegeman J, Vellema P, van der Hoek W, More S. 2013. Q fever in humans and farm animals in four European countries, 1982 to 2010. Euro Surveill. 18(8). pii: 20407.
- Gimenez DF 1964. Staining rickettsiae in yolk sac cultures. Stain Technol 30: 135–137.

- Gozalan A, Rolain JM, Ertek M, Angelakis E, Coplu N, Basbulut EA, Korhasan BB, Esen B. 2010. Seroprevalence of Q fever in a district located in the west Black Sea region of Turkey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 29(4):465-9. doi: 10.1007/s10096-010-0885-3.
- Guigno D, Coupland B, Smith E G, Farrell I D, Desselberger U, Caul E O. 1992. Primary humoral antibody response to *Coxiella burnetii*, the causative agent of Q fever. *J Clin Microbiol*. 30:1958–1967.
- Hackert VH, van der Hoek W, Dukers-Muijers N, de Bruin A, Al Dahouk S, Neubauer H, Bruggeman CA, Hoebe CJ. 2012. Q fever: single-point source outbreak with high attack rates and massive numbers of undetected infections across an entire region. *Clin Infect Dis*. 55(12):1591-9. doi: 10.1093/cid/cis734.
- Hackstadt T., Williams J.C. Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukaryotic cells by *Coxiella burnetii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1981. 78, 3240–3244
- Hagenaars JC, Wever PC, van Petersen AS, Lestrade PJ, de Jager-Leclercq MG, Hermans MH, Moll FL, Koning OH, Renders NH. 2014. Estimated prevalence of chronic Q fever among *Coxiella burnetii* seropositive patients with an abdominal aortic/iliac aneurysm or aorto-iliac reconstruction after a large Dutch Q fever outbreak. *J Infect*. 69(2):154-60. doi: 10.1016/j.jinf.2014.03.009.
- Hamzić S, Beslagić E, Puvacić S, Aljicević M. 2005. *Coxiella burnetii* infections as the public-health problem. *Med Arh*. (1):3-6.
- Hoover TA, Vodkin MH, Williams J 1992. A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. *Journal of Bacteriology* 174: 5540–5548.
- Islam A, Ferguson J, Givney R, Graves S. 2011. Seroprevalence to *Coxiella burnetii* among residents of the Hunter New England region of New South Wales, Australia. *Am J Trop Med Hyg*. 84(2):318-20. doi: 10.4269/ajtmh.2011.10-0268.
- Izzo AA, Marmion BP. Variation in interferon-gamma responses to *Coxiella burnetii* antigens with lymphocytes from vaccinated or naturally infected subjects. *Clin Exp Immunol*. 1993. 94: 507-515.
- Jajou R, Wielders CCH, Leclercq M, van Leuken J, Shamelian S, Renders N, van der Hoek W, Schneeberger P. 2014. Persistent high antibody titres against *Coxiella burnetii* after acute Q fever not explained by continued exposure to the source of infection: a case–control study. *BMC Infectious Diseases*. 14:629.
- Kampschreur LM, Hagenaars JC, Wielders CC, Elsmann P, Lestrade PJ, Koning OH, Oosterheert JJ, Renders NH, Wever PC. 2013. Screening for *Coxiella burnetii* seroprevalence in chronic Q fever high-risk groups reveals the magnitude of the Dutch Q fever outbreak. *Epidemiol Infect*. 141(4):847-51. doi: 10.1017/S0950268812001203.
- Kampschreur LM, Oosterheert JJ, Hoepelman AI, Lestrade PJ, Renders NH, Elsmann P, Wever PC. 2012. Prevalence of chronic Q fever in patients with a history of cardiac valve surgery in an area where *Coxiella burnetii* is epidemic. *Clin Vaccine Immunol*. 19(8):1165-9. doi: 10.1128/CVI.00185-12.
- Kilic S, Yilmaz GR, Komiya T, Kurtoglu Y, Karakoc EA. 2008. Prevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in blood donors in Ankara, Central Anatolia, Turkey. *New Microbiol*. 31(4):527-34.
- King LA, Goirand L, Tissot-Dupont H, Giunta B, Giraud C, Colardelle C, Duquesne V, Rousset E, Aubert M, Thiéry R, Calatayud L, Daurat G, Hocqueloux L, Cicchelerio V, Golliot F, de Valk H. 2011. Outbreak of Q fever, Florac, Southern France, Spring 2007. *Vector Borne Zoonotic Dis*. Apr;11(4):341-7. doi: 10.1089/vbz.2010.0050.



- Klee SR, Tyczka J, Ellerbrok H, Franz T, Linke S, Baljer G, Appel B 2006. Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. BMC Microbiology. 6:2 doi:10.1186/1471-2180-6-2.
- Klein, D., 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. Trends Mol. Med., [http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4914\(02\)02355-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4914(02)02355-9)
- Knobel DL, Maina AN, Cutler SJ, Ogola E, Feikin DR, Junghae M, Halliday JE, Richards AL, Breiman RF, Cleaveland S, Njenga MK. 2013. *Coxiella burnetii* in humans, domestic ruminants, and ticks in rural western Kenya. Am J Trop Med Hyg. 88(3):513-8. doi: 10.4269/ajtmh.12-0169.
- Ko WC, Liang CC, Chen HY, Chuang YC. 2000. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* infection in southern Taiwan. J Formos Med Assoc. 99(1):33-8.
- Kruszewska D, Lembowicz K, Tylewska-Wierzbanowska S. Possible sexual transmission of Q fever among humans. Clin Infect Dis. 1996 Jun;22(6):1087-8. PubMed PMID: 8783716.
- Kuchuloria T, Imnadze P, Mamuchishvili N, Chokheli M, Tsertsvadze T, Endeladze M, Mshvidobadze K, Gatsrelia L, Makhviladze M, Kanashvili M, Mikautadze T, Nanuashvili A, Kiknavelidze K, Kokaia N. 2015. Hospital-Based Surveillance for Infectious Etiologies Among Patients with Acute Febrile Illness in Georgia, 2008–2011. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Published online October 5, 2015; doi:10.4269/ajtmh.15-0400.
- Kumsa B, Socolovschi C, Almeras L, Raoult D, Parola P. 2015. Occurrence and Genotyping of *Coxiella burnetii* in Ixodid Ticks in Oromia, Ethiopia. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Published online September 21, 2015; doi:10.4269/ajtmh.14-0758.
- Lamas CC, Ramos RG, Lopes GQ, Santos MS, Golebiovski WF, Weksler C, Ferraiuoli GID, Fournier P, Lepidi H, Raoult D. 2013. Bartonella and Coxiella infective endocarditis in Brazil: molecular evidence from excised valves from a cardiac surgery referral center in Rio de Janeiro, Brazil, 1998 to 2009. International Journal of Infectious Diseases , Volume 17 , Issue 1 , e65 - e66
- Lamas CC, Rozental T, Bóia MN, Favacho AR, Kirsten AH, da Silva AP, de Lemos ER. 2009. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in human immunodeficiency virus-positive patients in Jacarepaguá, Rio de Janeiro, Brazil. Clin Microbiol Infect. 15 Suppl 2:140-1. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02144.x.
- Lamas CR. 2009. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in human immunodeficiency virus-positive patients in Jacarepaguá, Rio de Janeiro, Brazil. Clinical Microbiology and Infection, 15(Suplemento 2), 140-141.
- Lazzerini M, Tickell D. 2011. Antibiotics in severely malnourished children: systematic review of efficacy, safety and pharmacokinetics. Bull World Health Organ 89:593–606.
- Lemos ER, Rozental T, Mares-Guia MA, Almeida DN, Moreira N, Silva RG, Barreira JD, Lamas CC, Favacho AR, Damasco PV 2011. Q fever as a cause of fever of unknown origin and thrombocytosis: first molecular evidence of *Coxiella burnetii* in Brazil. Vector Borne and Zoonotic Diseases. 11(1):85-87 doi: 10.1089/vbz.2009.0261.
- Madariaga MG, Rezai K, Trenholme GM, Weinstein RA. Q fever: a biological weapon in your backyard. The Lancet Infectious Diseases, 2003. Volume 3, Issue 11, 709 - 721
- Mares-Guia MAMM, Rozental T, Guterres A, Gomes R, Almeida DNP, Moreira NS, Barreira JD, Favacho ARM, Santana AL, Lemos ERS. 2014. Molecular identification of the agent

- of Q fever – *Coxiella burnetii* – in domestic animals in State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 47:231–234
- Marmion BP, Storm PA, Ayres JG, Semendric L, Mathews L, Winslow W, Turra M, Harris RJ. 2005. Long-term persistence of *Coxiella burnetii* after acute primary Q fever. *Q J Med*. 98:7–20
- Marrie TJ 1990. Q fever - A review. *Can Vet J* 31(8): 555-63.
- Martins VCA, Bastos MS, Ramasawmy R, Figueiredo RP, Gimaque JBL, Braga WSM, Nogueira ML, Nozawa S, Naveca FG, Figueiredo LTM, Mourão MPG, 2014. Clinical and Virological Descriptive Study in the 2011 Outbreak of Dengue in the Amazonas, Brazil. *PLoS One*. Jun 30;9(6):e100535. doi: 10.1371/journal.pone.0100535. eCollection 2014.
- Maurin M, Raoult D. 1999. Q Fever. *Clin Microbiol Ver*. 12(4): 518–53.
- Maurin M., Benoliel A.M., Bongrand P., Raoult D. Phagolysosomal alkalisation and the bactericidal effect of antibiotics: the *Coxiella burnetii* paradigm. *J. Infect. Dis*. 1992. 166, 1097–1102.
- Mazyad SA, Hafez AO. 2007. Q fever (*Coxiella burnetii*) among man and farm animals in North Sinai, Egypt. *J Egypt Soc Parasitol*. 37(1):135-42.
- Mediannikov O, Fenollar F, Socolovschi C, Diatta G, Bassene H, Molez JF, Sokhna C, Trape JF, Raoult D. 2010. *Coxiella burnetii* in humans and ticks in rural Senegal. *PLoS Negl Trop Dis*. 4(4):e654. doi: 10.1371/journal.pntd.0000654.
- Miceli MH, Veryser AK, Anderson AD, Hofinger D, Lee SA, Tancik C. A case of person-to-person transmission of Q fever from an active duty serviceman to his spouse. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2010 Jun;10(5):539-41. doi: 10.1089/vbz.2009.0101. PubMed PMID: 20020811.
- Milazzo A, Hall R, Storm PA, Harris RJ, Winslow W, Marmion BP. Sexually transmitted Q fever. *Clin Infect Dis*. 2001 Aug 1;33(3):399-402. Epub 2001 Jul 5. PubMed PMID: 11438911.
- Monno R, Fumarola L, Trerotoli P, Cavone D, Giannelli G, Rizzo C, Ciceroni L, Musti M. 2009. Seroprevalence of Q fever, brucellosis and leptospirosis in farmers and agricultural workers in Bari, Southern Italy. *Ann Agric Environ Med*. 16(2):205-9.
- National Association of State Public Health Veterinarians and National Assembly of State Animal Health Officials. 2013. Prevention and Control of *Coxiella burnetii* Infection among Humans and Animals: Guidance for a Coordinated Public Health and Animal Health Response, 2013. [cited 2015]. Available from: [http://www.nasphv.org/Documents/Q\\_Fever\\_2013.pdf](http://www.nasphv.org/Documents/Q_Fever_2013.pdf)
- Nourse C, Allworth A, Jones A, Horvath R, McCormack J, Bartlett J, Hayes D, Robson JM, 2004. Three cases of Q fever osteomyelitis in children and a review of the literature. *Clin. Infect. Dis*. 39, e61–e66.
- Nusinovici S, Hoch T, Brahim ML, Joly A, Beaudeau F. 2015. The Effect of Wind on *Coxiella burnetii* Transmission Between Cattle Herds: a Mechanistic Approach. *Transbound Emerg Dis*. doi: 10.1111/tbed.12423. [Epub ahead of print]
- Omsland A, Cockrell DC, Howe D, Fischer ER, Virtaneva K, Sturdevant DE, Porcella H, Robert A 2009. Host cell-free growth of the Q fever bacterium *Coxiella burnetii* . *PNAS* 106(11): 4430–4434.

- Pape M, Mandraveli K, Nikolaidis P, Alexiou-Daniel St, Arvanitidou-Vagiona M. 2009. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in a healthy population from northern Greece. *Clinical Microbiology and Infection*. Volume 15, Issue Supplement s2, pages 148–149.
- Parker N, Robson J, Bell M. 2010. A serosurvey of *Coxiella burnetii* infection in children and young adults in South West Queensland. *Aust N Z J Public Health*. 34(1):79-82. doi: 10.1111/j.1753-6405.2010.00478.x
- Prabhu M, Nicholson WL, Roche AJ, Kersh GJ, Fitzpatrick KA, Oliver LD, Massung RF, Morrissey AB, Bartlett JA, Onyango JJ, Maro VP, Kinabo GD, Saganda W, Crump JA, 2011. Q Fever, Spotted Fever Group, and Typhus Group Rickettsioses Among Hospitalized Febrile Patients in Northern Tanzania. *Clin Infect Dis*, 53(4):e8–e15.
- Raoult D, Marrie T, Mege J, 2005. Natural history and pathophysiology of Q fever. *Lancet Infect Dis*, 5(4): 219-26.
- Raoult, D., 1993. Treatment of Q fever. *Antimicrob. Agents Chemother*. 37, 1733–1736.
- Rey D, Obadia Y, Tissot-Dupont H, Raoult D. 2000. Seroprevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* among pregnant women in South Eastern France. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 93(2):151-6.
- Ribeiro-Netto A, Nikitin T, Ribeiro IF. 1964. Q fever study in São Paulo: III. Prevalence among milkers and dairy farm workers. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 6:255-7.
- Riemann, HB. 1974. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Coxiella burnetii* among students and other personnel in veterinary colleges in California and Brazil. *American Journal of Epidemiology*, 100(3), 197-208.
- Riemann, HB. 1975. *Toxoplasma gondii* and *Coxiella burnetii* antibodies among Brazilian slaughterhouse employees. *American Journal of Epidemiology*, 102(5), 386-393
- Rodolakis A 2009. Q Fever in Dairy Animals. *Rickettsiology and Rickettsial Diseases-Fifth International Conference: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1166: 90–93.
- Rovero C, Granel B, Casalta JP, Lepidi H, Habib G, Raoult D, 2009. Coinfection with *Coxiella burnetii* in infectious endocarditis. *Clin Microbiol Infec*, 15(Suppl. 2):190–191
- Rolain JM, Gouriet F, Brouqui P, Larrey D, Janbon F, Vene S, Jarnestrom V, Raoult D. 2005. Concomitant or Consecutive Infection with *Coxiella burnetii* and Tickborne Diseases. *Clin Infect Dis*, 40:82–8.
- Rozental T, Mascarenhas LF, Rozenbaum R, Gomes R, Mattos GS, Magno CC, Almeida DN, Rossi MI, Favacho AR, de Lemos ER. 2012. *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever in Brazil: its hidden role in seronegative arthritis and the importance of molecular diagnosis based on the repetitive element IS1111 associated with the transposase gene. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 107(5):695-7.
- Schimmer B, Schotten N, van Engelen E, Hautvast JL, Schneeberger PM, van Duijnhoven YT. 2014. *Coxiella burnetii* seroprevalence and risk for humans on dairy cattle farms, the Netherlands, 2010-2011. *Emerg Infect Dis*. 20(3):417-25. doi: 10.3201/eid2003.131111.
- Scott GH, Williams JC. 1990. Susceptibility of *Coxiella burnetii* to chemical disinfectants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 590:291–296.
- Seshadri R, Paulsen IT, Eisen JA, Read TD, Nelson KE, Nelson WC, Ward NL, Tettelin H, Davidsen TM, Beanan MJ, Deboy RT, Daugherty SC, Brinkac LM, Madupu R, Dodson RJ, Khouri HM, Lee KH, Carty HA, Scanlan D, Heinzen RA, Thompson HA, Samuel JE, Fraser CM, Heidelberg JF. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii* . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003.100(9): 5455–60.

- Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde - Brasil. 2014. Boletim Epidemiológico. Volume 45, N° 17 – 2014. p 1-6. Available at: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/agosto/04/BE-2014-45--17---Dengue-SE29.pdf>
- Serbezov V, Kazár J, Novkirishki V, Gatcheva N, Kováčová E, Voynova V. 1999. Q Fever in Bulgaria and Slovakia. *Emerg Infect Dis.* 5(3):388-94.
- Siciliano RF, Castelli JB, Mansur AJ, Pereira dos Santos F, Colombo S, do Nascimento EM, Paddock CD, Brasil RA, Velho PE, Drummond MR, Grinberg M, Strabelli TM. 2015. *Bartonella spp.* and *Coxiella burnetii* Associated with Community-Acquired, Culture-Negative Endocarditis, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2015 Aug;21(8):1429-32.
- Siciliano R, Strabelli T, Paddock C, Jones T, Zeigler R, Rodrigues C, Nascimento E. 2007. Culture-negative endocarditis in Sao Paulo, Brazil. Serologic investigation of *Coxiella burnetii* and *Bartonella spp.* *Clinical Research in Cardiology*, 96(6).
- Siciliano RF, Strabelli TM, Zeigler R, Rodrigues C, Castelli JB, Grinberg M, Colombo S, da Silva LJ, Mendes do Nascimento EM, Pereira dos Santos FC, Uip DE. 2006. Infective endocarditis due to *Bartonella spp.* and *Coxiella burnetii*: experience at a cardiology hospital in Sao Paulo, Brazil. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078:215-22.
- Siciliano RR. 2008. Endocarditis due to *Coxiella burnetii* (Q fever). A rare or underdiagnosed disease? Case report. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(4), 409-412.
- Slabá K, Škultéty L, Toman R. 2005. Efficiency of various serological techniques for diagnosing *Coxiella burnetii* infection. *Acta virologica* 49: p 123 – 127.
- Slot E, Hogema BM, Molier M, Zaaijer HL. 2014. Screening of blood donors for chronic *Coxiella burnetii* infection after large Q fever outbreaks. *Transfusion*. 54(11):2867-70. doi: 10.1111/trf.12749. Epub 2014 Jun 12.
- Sprong H, Tjisse-Klasen E, Langelaar M, De Bruin A, Fonville M, Gassner F, Takken W, Wieren SV, Nijhof A, Jongejan F, Maassen CBM, Scholte EJ, Hovius JW, Hovius KE, Špitalská E, Van Duynhoven YT. 2012. Prevalence of *Coxiella Burnetii* in Ticks After a Large Outbreak of Q Fever. *Zoonoses and Public Health*. 59, p 69–75.
- Stein, A., N. A. Saunders, A. G. Taylor, and D. Raoult. 1993. Phylogenetic homogeneity of *Coxiella burnetii* strains as determined by 16S ribosomal RNA sequencing. *FEMS Microbiol. Lett.* 113:339–344.
- Tissot-Dupont H, Vaillant V, Rey S, Raoult D. 2007. Role of sex, age, previous valve lesion, and pregnancy in the clinical expression and outcome of Q fever after a large outbreak. *Clin Infect Dis.* 44(2):232-7.
- Toledo A, Jado I, Olmeda AS, Casado-Nistal MA, Gil H, Escudero R, Anda P. 2009. Detection of *Coxiella burnetii* in Ticks Collected from Central Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. Volume 9, Number 5, p 465-468.
- Tozer SJ, Lambert SB, Sloots TP, Nissen MD. 2011. Q fever seroprevalence in metropolitan samples is similar to rural/remote samples in Queensland, Australia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 30(10):1287-93. doi: 10.1007/s10096-011-1225-y.
- Travassos J, Ubatuba A, Silva N, Mello M. 1954. Febre Q no Rio de Janeiro. *Ciência e Cultura*, 6, pp. 199-200.

- Valencia MC, Rodriguez CO, Puñet OG, de Blas Giral I. 2000. Q fever seroprevalence and associated risk factors among students from the Veterinary School of Zaragoza, Spain. *Eur J Epidemiol.* 16(5):469-76.
- Valle LB. 1955. Investigação sobre a febre Q em São Paulo: estudo em tratadores de gado e em bovinos. *Arquivos da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo*, 9(1-2), 167-180.
- Van den Brom R, Schimmer B, Schneeberger PM, Swart WA, van der Hoek W, Vellema P. 2013. Seroepidemiological survey for *Coxiella burnetii* antibodies and associated risk factors in Dutch livestock veterinarians. *PLoS One.* 8(1):e54021. doi: 10.1371/journal.pone.0054021.
- van der Hoek W, Meekelenkamp JC, Dijkstra F, Notermans DW, Bom B, Vellema P, Rietveld A, van Duynhoven YT, Leenders AC. 2011. Proximity to goat farms and *Coxiella burnetii* seroprevalence among pregnant women. *Emerg Infect Dis.* 17(12):2360-3. doi: 10.3201/eid1712.110738.
- Vest KG, Clark LL. 2014. Serosurvey and observational study of US Army Veterinary Corps officers for Q fever antibodies from 1989 to 2008. *Zoonoses Public Health.* 61(4):271-82. doi: 10.1111/zph.12067.
- Vilibic-Cavlek T, Kucinar J, Ljubin-Sternak S, Kolaric B, Kaic B, Lazaric-Stefanovic L, Hunjak B, Mlinaric-Galinovic G. 2012. Vector Borne Zoonotic Dis. 12(4):293-6. doi: 10.1089/vbz.2011.0681.  
Prevalence of *Coxiella burnetii* antibodies among febrile patients in Croatia, 2008-2010.
- Vincent GA, Graves SR, Robson JM, Nguyen C, Hussain-Yusuf H, Islam A, Fenwick SG, Stenos J. 2015. Isolation of *Coxiella burnetii* from serum of patients with acute Q fever. *J Microbiol Methods.* 119:74-78. doi: 10.1016/j.mimet.2015.10.008. [Epub ahead of print]
- Voth DE, Heinzen RA: *Coxiella* type IV secretion and cellular microbiology. *Curr Opin Microbiol* 2009, 12:74-80.
- Waag D, Chulay J, Marrie T, England M, Williams J. 1995. Validation of an enzyme immunoassay for serodiagnosis of acute Q fever. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 14:421-427.
- Watzinger, F., Ebner, K., Lion, T., 2006. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Mol. Asp. Med.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.001>
- Whitney EA, Massung RF, Candee AJ, Ailes EC, Myers LM, Patterson NE, Berkelman RL. 2009. Seroepidemiologic and occupational risk survey for *Coxiella burnetii* antibodies among US veterinarians. *Clin Infect Dis.* 48(5):550-7. doi: 10.1086/596705.
- Whitney EA, Massung RF, Kersh GJ, Fitzpatrick KA, Mook DM, Taylor DK, Huerkamp MJ, Vakili JC, Sullivan PJ, Berkelman RL. 2013. Survey of laboratory animal technicians in the United States for *Coxiella burnetii* antibodies and exploration of risk factors for exposure. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 52(6):725-31.
- Wielders CCH, Kampschreur LM, Schneeberger PM, Jager MM, Hoepelman AIM, Leenders ACAP, Hermans MHA, Wever PC. 2012. Early Diagnosis and Treatment of Patients with Symptomatic Acute Q Fever Do Not Prohibit IgG Antibody Responses to *Coxiella burnetii*. *Clin Vaccine Immunol.* 19(10): 1661-1666.
- Wielders CCH, Boerman AW, Schimmer B, van den Brom R, Notermans DW, van der Hoek W, Schneeberger PM. 2015. Persistent High IgG Phase I Antibody Levels against *Coxiella burnetii* among Veterinarians Compared to Patients Previously Diagnosed with

Acute Q Fever after Three Years of Follow-Up. PLoS One. 10(1): e0116937. doi: 10.1371/journal.pone.0116937

Willems H, Thiele D, Frolich-Ritter R, Krauss H. 1994. Detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk using the polymerase chain reaction (PCR). Zentbl Vetmed 41: 580–7.

Wilson LE, Couper S, Prempeh H, Young D, Pollock KG, Stewart WC, Browning LM, Donaghy M. 2010. Investigation of a Q fever outbreak in a Scottish co-located slaughterhouse and cutting plant. Zoonoses Public Health. 57(7-8):493-8. doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01251.x.

Zhang L, Shan A, Mathew B, Yin J, Fu X, Zhang J, Lu J, Xu J, Dumler JS. 2008. Rickettsial Seroepidemiology among farm workers, Tianjin, People's Republic of China. Emerg Infect Dis. 14(6):938-40. doi: 10.3201/eid1406.071502.

Zhang GQ, Nguyen SaV, To H, Ogawa M, Hotta A, Yamaguchi T, Kim HJ, Fukushi H, Hirai K. 1998. Clinical Evaluation of a New PCR Assay for Detection of *Coxiella burnetii* in Human Serum Samples. Journal of Clinical Microbiology, Vol. 36, No. 1. p. 77–80

## 10. ARTIGOS RELACIONADOS AO CONTEÚDO DA TESE

Os artigos, listados abaixo, se encontram integralmente apresentados com uma breve descrição de seu conteúdo assim com a indicação do *status* de sua publicação.

10.1. Mares-Guia MAMM, Rozental T, Guterres A, Ferreira MSF, Botticini RDG, Terra AKC, Marraschi S, Bochner R, Lemos ERS. 2015. Molecular identification of Q fever in Patients with a Suspected Diagnosis of Dengue in Brazil in 2013-2014. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.

10.2 Mares-Guia MAMM, Rozental T, Guterres A, Gomes R, Almeida DNP, Moreira NS, Barreira JD, Favacho ARF, Santana AL, Lemos ERS. 2014. Molecular identification of the agent of Q fever – *Coxiella burnetii* – in domestic animals in State of Rio de Janeiro, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. (available at <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0076-2013>).

10.3. Mares-Guia MAMM, Lemos ERS. 2015. Febre Q: uma zoonose esquecida. Revista CFMV, ed. 66, jul-set/2015.

10.4. Mares-Guia MAMM, Rozental T, Guterres A, Lemos ERS. Clinical and epidemiological use of *Nested* PCR targeting the repetitive element *IS1111* associated with the transposase gene from *Coxiella burnetii*

ARTIGO 10.1: Molecular identification of Q fever in Patients with a Suspected Diagnosis of Dengue in Brazil in 2013-2014

SITUAÇÃO DO MANUSCRITO: Aceito para publicação na revista American Journal of Tropical Medicine and Hygiene

FATOR DE IMPACTO REVISTA: 2.699

REFERÊNCIA: Maria Angélica M.M. Mares-Guia, Tatiana Rozental, Alexandro Guterres, Michelle dos Santos Ferreira, Renato De Gasperis Botticini, Ana Kely Carolina Terra, Sandro Marraschi, Rosany Bochner, Elba R.S. Lemos.

RESUMO: A febre Q é uma importante causa de febre indiferenciada que raramente é reconhecida ou registrada no Brasil. O objetivo deste estudo foi o de verificar a presença de *Coxiella burnetii* durante um surto de dengue no município de Itaboraí, Rio de Janeiro, onde esta bactéria tinha previamente infectado seres humanos e animais domésticos. Amostras de sangue de pacientes clinicamente suspeitos de dengue foram testadas por PCR para *C. burnetii*; o DNA foi detectado em nove (3,3%) de 272 pacientes. Um deles estava coinfestado com o vírus da dengue, que também foi detectado em outros 166 (61,3%) pacientes. A sequência de nucleotídeos da amplificação por PCR e sequenciamento de DNA dos elementos IS1111 transposase no genoma de *C. burnetii*, exibiu 99% de identidade com as sequências no GenBank. A detecção de *C. burnetii* em pacientes com suspeita de dengue indica que a conscientização e o conhecimento da febre Q precisa ser reforçada e que esta bactéria está presente no Brasil. Finalmente, considerando que um resultado molecular negativo não exclui completamente o diagnóstico da febre Q e o ensaio sorológico baseado em soroconversão não foi disponível, o número real da presença desta zoonose –pode ser provavelmente muito maior do que o relatado no presente estudo.



## Molecular Identification of Q Fever in Patients with a Suspected Diagnosis of Dengue in Brazil in 2013–2014

Maria Angélica M. M. Mares-Guia, Tatiana Rozental, Alexandro Guterres, Michelle dos Santos Ferreira, Renato De Gasperis Botticini, Ana Kely Carolina Terra, Sandro Marraschi, Rosany Bochner, and Elba R. S. Lemos\*  
Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil; Laboratório de Análises Clínicas, Hospital Municipal Desembargador Leal Junior, Rio de Janeiro, Brazil; Vigilância Epidemiológica Municipal de Itaboraí, Município de Itaboraí, Rio de Janeiro, Brazil; Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde, Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil

**Abstract.** Q fever is an important cause of undifferentiated fever that is rarely recognized or reported in Brazil. The objective of this study was to look for the presence of *Coxiella burnetii* during a dengue fever outbreak in the municipality of Itaboraí, Rio de Janeiro, Brazil, where this bacterium had previously infected humans and domesticated animals. Blood samples from clinically suspected dengue fever patients were tested by polymerase chain reaction (PCR) for *C. burnetii*; the DNA was detected in nine (3.3%) of 272 patients. One was coinfecting with dengue virus, which was also detected in another 166 (61.3%) patients. The nucleotide sequence of PCR amplification and DNA sequencing of the IS1111 transposase elements in the genome of *C. burnetii* exhibited 99% identity with the sequence in GenBank. The detection of *C. burnetii* in patients suspected of dengue fever indicates that awareness and knowledge of Q fever should be strengthened and that this bacterium is present in Brazil. Finally, because a negative molecular result does not completely rule out the diagnosis of Q fever and the serological assay based on seroconversion was not available, the actual number of this zoonosis is likely to be much higher than that reported in this study.

### INTRODUCTION

Q fever is a zoonosis caused by *Coxiella burnetii*, a small intracellular gram-negative bacterium that is naturally maintained in many species: mammals, birds, and arthropods.

**AU1** Transmitted to humans primarily by aerosol inhalation, the bacterium causes a broad-spectrum clinical manifestation including self-limiting flu-like acute forms, chronic conditions, and, more rarely, endocarditis with negative blood cultures and death.<sup>1–3</sup> Q fever is poorly known in most countries of the world, with the exception of the European countries, Australia, and the United States.<sup>4,5</sup> Over 4,000 cases have been identified in the Netherlands,<sup>6</sup> and an increasing number of cases have been identified in American military bases in Afghanistan and Iraq.<sup>7,8</sup> *Coxiella burnetii* is considered as a tier 2 select agent and potential bioterrorism threat by the U.S. Centers for Disease Control and Prevention and has attracted much attention from the scientific community since 2009.<sup>9</sup>

Although serological tests for *C. burnetii* infection have been available in Brazil since 1953,<sup>10</sup> it was not until 2008 that the bacterium was characterized molecularly from a patient with fever, thrombocytopenia, and a history of contact with goat abortion products in Rio de Janeiro, Brazil.<sup>11,12</sup> Since then, although sporadic cases have been confirmed<sup>13–15</sup> including endocarditis, the most severe form of chronic disease,<sup>16</sup> it was only in 2014 that Q fever become a notifiable disease in Brazil. Acute Q fever is difficult to diagnose because it shares similar manifestations with a large number of infectious diseases, for example, fever, headache, myalgia, and/or pneumonia. Q fever can be confused with influenza, dengue, malaria, leptospirosis, and hantaviruses, among other diseases.<sup>17</sup>

In Brazil, where dengue outbreaks are often identified (e.g., the dengue virus [DENV] 1–4 introduction in 1986, 1990, 2000, and 2011),<sup>18</sup> it is common for people exhibiting clinical features compatible with dengue to skip laboratory confirmation of the disease. This fact, combined with the lack of awareness of Q fever, make this zoonosis an apparently non-existent infectious disease. It has been proposed that Q fever should be included in the list of differential diagnoses for flu-like diseases in the Brazilian territory. In this study, we looked for Q fever in suspected dengue patients in a public hospital in Itaboraí, Rio de Janeiro, where the first molecularly identified Brazilian case of Q fever was found in 2008.<sup>11</sup>

### MATERIALS AND METHODS

**Patient and sample collection.** This hospital-based cross-sectional study was conducted at the Desembargador Leal Junior Hospital (DLJH) in the municipality of Itaboraí (22°44'51" S, 42°51'21" W), Rio de Janeiro, where *C. burnetii* infection was detected in human and domesticated animals in 2008.<sup>11,12</sup> From March 2013 to October 2014, all patients admitted to DLJH with a diagnosis of dengue infection and who lived in Itaboraí or the surrounding areas were considered for entry into the study. Clinical and epidemiological data were systematically collected by the hospital's surveillance group using the national dengue surveillance system (SINAN). Serum samples were tested in the laboratory of the DLJH for the presence of DENV nonstructural protein 1 by enzyme-linked immunosorbent assay (Plateleia **AU4** Bio-Rad®) and dengue-specific IgM by capture assay (**AU5** Panbio®). A 1-mL aliquot of blood was sent to the Laboratory of Hantaviruses and Rickettsioses, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, for evaluation of *C. burnetii* infection (see section Determination of *C. burnetii* infection). This study was approved by the Ethics Committee of the FIOCRUZ, under number 552/10. Because these analyses were part of routine surveillance activities in an area with outbreaks of dengue and Q fever, patients were not required to provide informed consent.

**AU2** \*Address correspondence to Elba R. S. Lemos, Laboratório de Hantaviruses e Rickettsioses, FIOCRUZ, Pavilhão Hélio e Peggy Pereira, sala B115, Avenida Brasil 4365, Mangunhos, 21040-900 Rio de Janeiro, Brazil. E-mail: elemos@ioc.fiocruz.br

**Determination of *C. burnetii* infection.** Blood samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  in the DLJH and transported to the Laboratory of Hantaviruses and Rickettsioses for molecular analysis. Blood samples were evaluated by polymerase chain reaction (PCR) as previously described, using primers targeting the ISIII transposase elements in the genome of *C. burnetii* (5'-TATGTATCCACCGTAGCCAGTC-3' and 5'-CCCAACAACACCTCCTTATTC-3'), which produce an amplification product of 687 bp.<sup>19-21</sup> DNA was extracted from 200  $\mu\text{L}$  of the blood samples using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) in accordance with the manufacturer's instructions. Negative controls were included in each extraction to check for possible DNA contamination. Each 25- $\mu\text{L}$  PCR reaction was performed with 4  $\mu\text{L}$  DNA in nuclease-free water (Promega, Madison, WI) containing 0.2  $\mu\text{M}$  primers (IDT/Prodimol, Belo Horizonte, Brazil), 200  $\mu\text{M}$  deoxynucleotide triphosphates, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , and 0.1 U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA). The procedure consisted of an initial denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 minutes, then 40 consecutive cycles of denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 30 seconds, annealing at  $60^{\circ}\text{C}$  for 30 seconds, and extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 1 minute, then a final extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 7 minutes.

The PCR reactions were subjected to agarose gel electrophoresis, and the appropriately sized fragments were purified using the BigDye Terminator<sup>®</sup> X-Purification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). The fragments were sequenced using the BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) on an ABI PRISM 3100 Nucleic Acid Sequence Analyzer (Applied Biosystems). The obtained sequences were compared with the GenBank *C. burnetii* ISIII transposase elements sequences using the BLAST<sup>®</sup> program.<sup>22</sup>

**Data analysis.** A  $\chi^2$  test was used to compare epidemiological variables between dengue-positive and dengue-negative cases. Fisher's exact test was used in smaller samples. Statistical analyses were performed using BioEstat 5.0<sup>®23</sup> and significance was set at  $P < 0.05$ . Significance was not tested for Q fever cases because of the small sample size.

## RESULTS

### PATIENTS AND SEROLOGICAL ANALYSIS.

In total, 272 patients were admitted to the DLJH with suspected dengue infection during the study period: 246 patients in 2013 and 26 in 2014. A total of 150 (58%) patients were women and 108 (425) were men, with a mean age of  $35.2 \pm 18.8$  years and a range of 1 month to 88 years. Dengue infection was confirmed by laboratory tests in 167 (61.3%) patients. Among the 258 patients with available clinical manifestations, 156 (60.4%) were positive for dengue.

**Table 1.** The clinical and epidemiological data are shown in Table 1.

**Sample positive PCR and sequencing.** All 272 blood samples were analyzed for *C. burnetii* DNA by PCR. The appropriate 687-bp product was observed in nine samples, all from patients admitted during 2013. The geographic distribution of the Q fever cases in relation with index case confirmed in

2008 is displayed in Figure 1. Cases 1, 2, 6, 7, and 8 were identified in peri-urban areas within 5 km of index area where animals that excreted *C. burnetii* were also detected.<sup>12</sup>

TABLE 1

Comparison of the clinical and epidemiological data between dengue positive and negative cases reported in the municipality Itaboraí, Rio de Janeiro (2013-2014), Brazil

Variable	Dengue positive (N = 156) n (%)	Dengue negative (N = 102) n (%)	P*
Gender			
Male	64 (41)	44 (33.1)	0.7368
Female	92 (58.9)	58 (56.8)	
Age (years)			
$\leq 10$	5 (3.2)	8 (7.8)	<b>0.0239</b>
11-20	33 (21.1)	30 (29.4)	
21-30	25 (16)	21 (20.5)	
31-40	36 (23)	9 (8.8)	
41-50	24 (15.3)	12 (11.7)	
$\geq 51$	33 (32.6)	20 (19.6)	
Fever	152 (97.4)	89 (87.2)	<b>0.0013</b>
Headache	146 (93.5)	82 (80.3)	<b>0.0012</b>
Myalgia	134 (85.9)	81 (79.4)	0.1717
Prostration	86 (55.1)	69 (67.6)	<b>0.0447</b>
Nausea/vomiting	98 (62.8)	55 (53.9)	0.1549
Retro-orbital pain	98 (62.8)	51 (50.0)	<b>0.0415</b>
Arthralgia	60 (38.4)	43 (42.1)	0.5535
Diarrhea	51 (32.6)	28 (27.4)	0.3718
Petechiae	47 (30.1)	19 (18.6)	<b>0.0384</b>
Rash	36 (23.0)	14 (13.7)	0.0632
Hemorrhagic manifestations	2 (1.28)	1 (0.9)	1.000
Respiratory disorders	1 (0.64)	1 (0.9)	1.000

\*Statistically-significant P values are in bold.

The other four cases were located more than 10 km away from the index case's house, in farm areas. One of these nine patients also had dengue infection, indicating that the patient was coinfecting with both pathogens. The *C. burnetii* DNA fragment in the nine patients was 99% identical to the sequence in GenBank (Table 2).

## DISCUSSION

This article reports the findings of a Q fever surveillance study conducted in an area endemic for dengue in Rio de Janeiro, from March 2013 to October 2014. In Brazil, approximately 2 million dengue cases were recorded in 2013 and 587,800 dengue cases were recorded in 2014. One of the most affected areas was the state of Rio de Janeiro, where more than 220,000 dengue cases were recorded during this period, resulting from DENV-1 epidemic (Brazilian Ministry of Health, 2015). In the municipality of Itaboraí, where this study was performed, 5,881 and 376 dengue cases were recorded in 2013 and 2014, respectively. The relatively low number of dengue cases recorded in 2014 explains the relatively small number of cases included in this study in 2014.

Of the 272 patients we evaluated with suspected dengue fever, 61.3% were confirmed to be infected with DENV. The most common age group with dengue infection was 31-40 years. Fever, headache, prostration, petechiae, and retro-orbital pain were frequently observed in patients with dengue infection, consistent with previous studies.<sup>24,25</sup> Six of the nine Q fever-positive patients had fever, headache, and myalgia,<sup>26</sup> which are the most common symptoms of dengue (Table 1). The symptoms and differential diagnosis of these infectious diseases are similar, making accurate clinical diagnosis difficult without laboratory confirmation, especially during dengue outbreak.

Currently, serological testing is the most frequently used approach to identify Q fever. The definitive serological

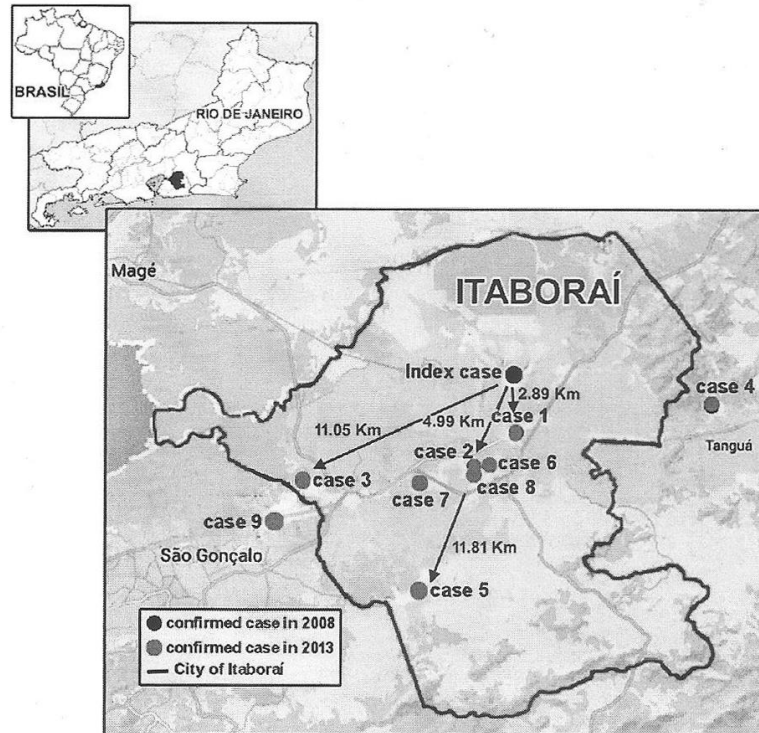


FIGURE 1. Spatial distribution of individuals with Q fever in Itaboraí and the surrounding areas, state of Rio de Janeiro, Brazil. The black dot represents the index Q fever cases (place of residence) and the gray dots represent the nine cases, which occurred during period of study.

diagnosis of Q fever is based on seroconversion, performed with a blood sample collected in the early and convalescence phases in febrile cases.<sup>1</sup> Because laboratory testing of suspected dengue cases routinely occurs in the first 5 days of illness, it was not possible during the study to obtain a second blood sample.<sup>25</sup> For this reason, and, less often, because of an insufficient volume of the blood available, the Q fever serological assay was not included in this study.

During the study period, five Q fever cases were identified in peri-urban areas within 5 km of the index case's house whereas other cases were located more than 10 km away from the index case's house, in farm areas. Since the 1950s,

several studies have demonstrated that wind plays a role in *C. burnetii* transmission.<sup>27-29</sup> In this context, our results, in combination with conclusions from these studies associated with the presence of infected animals (sheep, dogs, and cats) in the index case's house,<sup>11,12</sup> indicate that wind can be an epidemiologic factor in Q fever outbreaks occurring near sheep-rearing areas.

We identified Q fever based on the presence of the bacterium in the blood sample. The molecular analysis showed *C. burnetii* DNA in samples from 3.3% of the suspected dengue cases. Evidence of coinfection between DENV and *C. burnetii* was observed in only one of the 272 patients.

TABLE 2  
Characteristics of the nine patients with Q fever, in Itaboraí and the surrounding areas, Rio de Janeiro, Brazil

Patient	Age (years)/gender	Date of specimen collection (month/year)	Clinical manifestations*	GenBank accession no.
Patient 1*	78/M	April/2013	F, H, M, P, N/V, A	KP645185
Patient 2	15/F	April/2013	F, H, M, R, P, N/V	KP645186
Patient 3	28/F	May/2013	F, H, M, R, D, N/V	KP645187
Patient 4	16/M	May/2013	F, H, M, P, PT	KR091975
Patient 5	13/F	September/2013	F, ROP, AP, A	KP645188
Patient 6	8/M	September/2013	F, R, P	KP645189
Patient 7	67/M	October/2013	F, H, M, P, N/V, ROP, A	KP645190
Patient 8	62/F	October/2013	F, H, M, R, D, N/V, ROP, A	KP645191
Patient 9	25/F	November/2013	F, H, M, P, N/V, A	KR091976

F = female; M = male.  
 \*A = arthralgia; AP = abdominal pain; D = diarrhea; F = fever; H = headache; HM = hemorrhagic manifestations; M = myalgia; N/V = nausea/vomiting; P = prostration; PT = petechiae; R = rash; RD = respiratory disorders; ROP = retro-orbital pain.  
 †Patient 1 contained presence of dengue virus nonstructural protein 1 by enzyme-linked immunosorbent assay (Plateleia BIORAD®) and dengue-specific IgM by capture assay (Panbio®), indicating coinfection with dengue virus.

Although we know of no reports of concomitant infection with *C. burnetii* and DENV, there are reports of patients with infectious endocarditis due to typical microorganisms (*Streptococcus* and *Enterococcus*) and *C. burnetii*<sup>30</sup> and serological evidence of coinfection with *C. burnetii* and tick-borne agents such as *Rickettsia conorii*, *Rickettsia slovaca*, and *Francisella tularensis*.<sup>31</sup> Since these infections can present overlapping clinical manifestations, Q fever should be included in the differential diagnosis of acute febrile diseases and infectious endocarditis in areas where Q fever cases have previously occurred.

Our findings, together with other data published in the last decade in Brazil—including the recent report of a Q fever outbreak in the state of São Paulo (Center for Strategic Information and Health Surveillance of São Paulo state, Brazil, 2015)—highlight the need to include this zoonosis in febrile syndromic surveillance programs. This is especially important in cases where patients have compatible epidemiological history and have a risk factor for chronic Q fever, such as a history of valvular surgery, vascular grafting, aneurysm, kidney failure, immunosuppression, or advanced age.<sup>32</sup>

Acute Q fever is rarely recognized because it is asymptomatic or accompanied by mild clinical manifestations that do not require hospitalization. Given that all patients included in this study were admitted to the hospital and considering that serological testing for Q fever was not performed because of the lack of second blood sample and an insufficient volume of blood, the incidence of Q fever can be probably greater than the 3.3% observed here. Nevertheless, our observation is similar to a finding in Tanzania where serum antibodies against *C. burnetii* were detected in 5% of hospitalized patients.<sup>33</sup> As this zoonosis was only recently (2014) classified as a notifiable disease in Brazil, its inclusion in febrile syndromic surveillance programs and a greater availability of diagnostic tests should lead to greater awareness and knowledge about this disease.

#### CONCLUSION

Although Q fever is usually a self-limiting disease, a specific antimicrobial therapy for the prevention of chronic Q fever should be used, mainly, for high-risk patients. Being more often similar to other infectious or noninfectious diseases, Q fever often goes unrecognized. This is especially true during outbreaks of other diseases with clinical manifestations similar to dengue, leptospirosis, and influenza, among others. However, given the potential for chronic Q fever development, greater attention should be given to this zoonosis, whose etiologic agent has been frequently identified in Brazil during the last decade. We conclude that Q fever is present in Brazil but can be misdiagnosed with other infectious diseases, especially dengue. We recommend that Q fever be included in the list of differential diagnoses of flu-like diseases, especially in patients with a compatible epidemiological history and having a risk factor for chronic Q fever.

Received August 8, 2015. Accepted for publication September 19, 2015.

Financial support: This study was supported by FIOCRUZ e CNPq.

Authors' addresses: Maria Angélica M. M. Mares-Guia, Tatiana Rozental, Alexandro Guterres, Michelle dos Santos Ferreira, and

Elba R. S. Lemos, Laboratório de Hantaviruses e Rickettsioses, Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil, E-mails: amguia@ioc.fiocruz.br, rozental@ioc.fiocruz.br, guterres@ioc.fiocruz.br, micferreira1@gmail.com, and elba.lemos@ioc.fiocruz.br. Renato De Gasperis Botticini, Laboratório de Análises Clínicas, Hospital Municipal Desembargador Leal Junior, Rio de Janeiro, Brazil, E-mail: labhmdlj@itaborai.rj.gov.br. Ana Kely Carolina Terra and Sandro Marraschi, Vigilância Epidemiológica Municipal de Itaboraí, Município de Itaboraí, Rio de Janeiro, Brazil, E-mails: anakely.terra@gmail.com and sandromarraschi@uol.com.br. Rosany Bochner, Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde, Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil, E-mail: robochner@gmail.com.

#### REFERENCES

- Angelakis E, Raoult D, 2010. Review Q fever. *Vet Microbiol* 140: 297–309.
- Fenollar F, Fournier PE, Raoult D, 2004. Molecular detection of *Coxiella burnetii* in the sera of patients with Q fever endocarditis or vascular infection. *J Clin Microbiol* 42: 4919–4924.
- Maurin M, Raoult D, 1999. Q fever. *Clin Microbiol Rev* 12: 518–553.
- Georgiev M, Afonso A, Neubauer H, Needham H, Thiéry R, Rodolakis A, Roest HJ, Stärk KD, Stegeman JA, Vellema P, van der Hoek W, More SJ, 2013. Q fever in humans and farm animals in four European countries, 1982 to 2010. *Euro Surveill* 18: 20407. Available at: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20407>.
- Anderson AD, Kruszon-Moran D, Loftis AD, McQuillan G, Nicholson WL, Priestley RA, Candee AJ, Patterson NE, Massung RF, 2009. Seroprevalence of Q fever in the United States, 2003–2004. *Am J Trop Med Hyg* 81: 691–694.
- Delsing CE, Kullberg BJ, Bleeker-Rovers CP, 2010. Q fever in the Netherlands from 2007 to 2010. *Neth J Med* 68: 382–387.
- Anderson AD, Smoak B, Shuping E, Ockenhouse C, Petrucelli B, 2005. Q fever and the U.S. military [letter]. *Emerg Infect Dis [serial on the Internet]*. Aug. Available at: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1108.050314>.
- Aronson NE, Sanders JW, Moran KA, 2006. In harm's way: infections in deployed American military forces. *Clin Infect Dis* 43: 1045–1051.
- Centers for Disease Control and Prevention, XXXX. *Bioterrorism Agents/Diseases (Page last updated February 12, 2007)*. Available at: <http://emergency.cdc.gov/agent/agentlist.asp>.
- Brandão H, Valle L, Christóvão D, 1953. Investigações sobre a febre Q em São Paulo. Estudo sorológico em operários de um frigorífico. *Arq Fac Hig Saude Publica Univ Sao Paulo* 7: 127–133.
- Lemos ER, Rozental T, Mares-Guia MA, Almeida DN, Moreira N, Silva RG, Barreira JD, Lamas CC, Favacho AR, Damasco PV, 2011. Q fever as a cause of fever of unknown origin and thrombocytosis: first molecular evidence of *Coxiella burnetii* in Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11: 85–87.
- Mares-Guia MAMM, Rozental T, Guterres A, Gomes R, Almeida DNP, Moreira NS, Barreira JD, Favacho ARM, Santana AL, Lemos ERS, 2014. Molecular identification of the agent of Q fever—*Coxiella burnetii*—in domestic animals in State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 47: 231–234.
- Lamas CC, Ramos RG, Lopes GO, Santos MS, Golebiowski WF, Weksler C, Ferraiuoli GID, Fournier P, Lepidi H, Raoult D, 2013. *Bartonella* and *Coxiella* infective endocarditis in Brazil: molecular evidence from excised valves from a cardiac surgery referral center in Rio de Janeiro, Brazil, 1998 to 2009. *Int J Infect Dis* 17: e65–e66.
- Rozental T, Mascarenhas LF, Rozenbaum R, Gomes R, Mattos GS, Magno CC, Almeida DN, Rossi MI, Favacho AR, de Lemos ER, 2012. *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever in Brazil: its hidden role in seronegative arthritis and the importance of molecular diagnosis based on the repetitive element IS1111 associated with the transposase gene. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 695–697.

15. Lamas CR, 2009. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in human immunodeficiency virus-positive patients in Jacarepaguá, Rio de Janeiro, Brazil. *Clin Microbiol Infect* 15: 140–141.
16. Siciliano RR, 2008. Endocarditis due to *Coxiella burnetii* (Q fever). A rare or underdiagnosed disease? Case report. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 409–412.
17. Arricau-Bouvery N, Rodolakis A, 2005. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet Res* 36: 327–349.
18. Heringer M, Nogueira RM, de Filippis AM, Lima MR, Faria NR, Nunes PC, Nogueira FB, Dos Santos FB, 2015. Impact of the emergence and re-emergence of different dengue viruses' serotypes in Rio de Janeiro, Brazil, 2010 to 2012. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 109: 268–274.
19. Willems H, Thiele D, Frolich-Ritter R, Krauss H, 1994. Detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk using the polymerase chain reaction (PCR). *J Vet Med* 41: 580–587.
20. Hoover TA, Vodkin MH, Williams JC, 1992. A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. *J Bacteriol* 174: 5540–5548.
21. Denison AM, Thompson HA, Massung RF, 2007. IS1111 insertion sequences of *Coxiella burnetii*: characterization and use for repetitive element PCR-based differentiation of *Coxiella burnetii* isolates. *BMC Microbiol* 7: 91.
22. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ, 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403–410.
23. Ayres M, Ayres M Jr, Ayres DL, Santos AS, 2007. *BioEstat—Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas*. Belém/PA, Brasil: Ong Mamirauá.
24. Daumas RP, Passos SRL, Oliveira RVC, Nogueira RMR, Georg I, Marzochi KBF, Patrícia Brasil P, 2013. Clinical and laboratory features that discriminate dengue from other febrile illnesses: a diagnostic accuracy study in Rio de Janeiro, Brazil. *BMC Infect Dis* 13: 77.
25. Martins VCA, Bastos MS, Ramasawmy R, Figueiredo RP, Gimaque JBL, Braga WSM, Nogueira ML, Nozawa S, Naveca FG, Figueiredo LTM, Mourão MPG, 2014. Clinical and virological descriptive study in the 2011 outbreak of dengue in the Amazonas, Brazil. *PLoS One* 9: e100535.
26. Anderson A, Bijlmer H, Fournier PE, Graves S, Hartzell J, Kersh GJ, Limonard G, Marrie TJ, Massung RF, McQuiston JH, Nicholson WL, Paddock CD, Sexton DJ, 2013. Diagnosis and management of Q fever—United States, 2013: recommendations from CDC and the Q Fever Working Group. *MMWR* 62: 1–30. Available at: <http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/tr/tr6203.pdf>.
27. Hawker JJ, Ayres JG, Blair I, Evans MR, Smith DL, Smith EG, Burge PS, Carpenter MJ, Caul EO, Coupland B, Desselberger U, Farrell ID, Saunders PJ, Wood MJ, 1998. A large outbreak of Q fever in the West Midlands: windborne spread into a metropolitan area? *Commun Dis Public Health* 1: 180–187.
28. Gilsdorf A, Kroh C, Grimm S, Jensen E, Wagner-Wiening C, Alpers K, 2008. Large Q fever outbreak due to sheep farming near residential areas, Germany, 2005. *Epidemiol Infect* 136: 1084–1087.
29. Kersh GJ, Fitzpatrick KA, Self JS, Priestley RA, Kelly AJ, Lash RR, Marsden-Haug N, Nett RJ, Bjork A, Massung RF, Anderson AD, 2013. Presence and persistence of *Coxiella burnetii* in the environments of goat farms associated with a Q fever outbreak. *Appl Environ Microbiol* 79: 1697–1703.
30. Rovey C, Granel B, Casalta JP, Lepidi H, Habib G, Raoult D, 2009. Coinfection with *Coxiella burnetii* in infectious endocarditis. *Clin Microbiol Infect* 15 (Suppl 2): 190–191.
31. Rolain JM, Gouriet F, Brouqui P, Larrey D, Janbon F, Vene S, Jarnestrom V, Raoult D, 2005. Concomitant or consecutive infection with *Coxiella burnetii* and tickborne diseases. *Clin Infect Dis* 40: 82–88.
32. Kampschreur LM, Dekker S, Hagenaars JC, Lestrade PJ, Renders NH, de Jager-Leclercq MG, Hermans MH, Groot CA, Groenwold RH, Hoepelman AI, Wever PC, Oosterheert JJ, 2012. Identification of risk factors for chronic Q fever, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 18: 563–570.
33. Prabhu M, Nicholson WL, Roche AJ, Kersh GJ, Fitzpatrick KA, Oliver LD, Massung RF, Morrissey AB, Bartlett JA, Onyango JJ, Maro VP, Kinabo GD, Saganda W, Crump JA, 2011. Q fever, spotted fever group, and typhus group rickettsioses among hospitalized febrile patients in northern Tanzania. *Clin Infect Dis* 53: e8–e15.

ARTIGO 10.2: Molecular identification of the agent of Q fever – *Coxiella burnetii* – in domestic animals in State of Rio de Janeiro, Brazil.

SITUAÇÃO DO MANUSCRITO: Publicado na revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

FATOR DE IMPACTO REVISTA: 0.977

REFERÊNCIA: Maria Angélica Monteiro de Mello Mares-Guia, Tatiana Rozental, Alexandro Guterres, Raphael Gomes, Daniele Nunes de Almeida, Namir Santos Moreira, Jairo Dias Barreira, Aleksandra Rodrigues Favacho, Andrea Lopes Santana, Elba Regina Sampaio de Lemos

RESUMO: Ao longo dos últimos anos, o número de casos de febre Q tem aumentado em todo o mundo. Uma investigação epidemiológica foi realizada na área em que foi feito o primeiro relato molecular de febre Q no Brasil. Imunofluorescência indireta (IFI) e PCR de *Coxiella burnetii* visando o gene *htpAB* foram realizados em amostras de 14 cães (sangue); 1 gato (sangue); 10 cabras (sangue, leite, swab vaginal e swab anal); 3 ovelhas (sangue); e 2 cavalos (sangue). Dois cães, duas ovelhas e cinco cabras apresentaram sororreatividade. O DNA foi amplificado a partir de 6 amostras de leite de cabras e 2 amostras sangue de cães, respectivamente. A sequência dos produtos de amplificação exibiu 99% de semelhança com a sequência de *C. burnetii* RSA 331 (GenBank - CP000890). Os resultados confirmam a infecção por *C. burnetii* em animais no Rio de Janeiro e reforçam a necessidade de vigilância da febre Q no Brasil.

## Molecular identification of the agent of Q fever – *Coxiella burnetii* – in domestic animals in State of Rio de Janeiro, Brazil

Maria Angélica Monteiro de Mello Mares-Guia<sup>[1]</sup>, Tatiana Rozental<sup>[1]</sup>, Alexandro Guterres<sup>[1]</sup>,  
Raphael Gomes<sup>[1]</sup>, Daniele Nunes de Almeida<sup>[1]</sup>, Namir Santos Moreira<sup>[1]</sup>,  
Jairo Dias Barreira<sup>[2]</sup>, Alexsandra Rodrigues Favacho<sup>[1]</sup>, Andrea Lopes Santana<sup>[3]</sup>  
and Elba Regina Sampaio de Lemos<sup>[1]</sup>

[1]. Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. [2]. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ. [3]. Secretaria de Saúde do Município de Itaboraí, Itaboraí, RJ.

### ABSTRACT

**Introduction:** Over the last recent years, the number of Q fever cases have has increased throughout the world. An epidemiological investigation was performed in the area in which the first molecular documentation of Q fever in Brazil was previously reported. **Methods:** Indirect immunofluorescence assay (IFA) and PCR of *Coxiella burnetii* targeting the *hpaAB* gene were performed in samples from 14 dogs (blood); 1 cat (blood); 10 goats (blood, milk, vaginal swab and anal swab); 3 sheep (blood); and 2 horses (blood). **Results:** Two dogs, two sheep and five goats were seroreactive. DNA was amplified from 6 milk and 2 blood samples from goats and from dogs, respectively. The sequence of the amplicons exhibited 99% sequence similarity with the homologous sequence of the *hpaAB* gene of *C. burnetii* RSA 331 (GenBank - CP000890). **Conclusions:** The results confirm *C. burnetii* infection in animals in Rio de Janeiro and reinforce the need for the surveillance of Q fever in Brazil.

**Keywords:** Q fever. *Coxiella burnetii*. Domestic animals. Molecular diagnosis. Brazil.

Q fever is a zoonosis caused by *Coxiella burnetii*, a small obligate intracellular gram-negative bacterium of the Legionellales order that has tropism for monocyte and macrophage cells<sup>1</sup>. This zoonosis is transmitted to humans through the inhalation of aerosols from contaminated soil and animal excrement, primarily parturient fluids. Ingestion, especially drinking raw milk, is also likely a minor factor in the transmission of *C. burnetii*. Although *C. burnetii* has been isolated from arthropods, primarily ticks, the arthropod-borne transmission of Q fever in humans is unlikely to be significant<sup>2</sup>. In humans, the disease has a broad spectrum of clinical manifestations, ranging from a limited febrile illness, pneumonia and hepatitis to life-threatening forms such as endocarditis and meningoencephalitis<sup>2</sup>.

The definitive diagnosis of Q fever is based on serological, molecular and isolation methods. Serological testing is the most commonly used method, specifically using the indirect immunofluorescence assay (IFA). Acute and chronic infections

are characterized by different serological profiles; antigen phase II and phase I tests are used for the diagnosis of acute and chronic Q fever, respectively<sup>2</sup>.

Q fever is widespread throughout in the world and cases occur on all continents, with the exception of New Zealand<sup>2</sup>. Although cattle, sheep and goats are considered to be the primary reservoirs of *C. burnetii*, several species of wild and domesticated vertebrates, including mammals, reptiles and birds, have been associated with this zoonotic disease agent<sup>2</sup>. Since the 1990s, several outbreaks of Q fever have been described worldwide, especially in Europe, where more than 3,500 reported cases occurred in the Netherlands<sup>3</sup>. In Brazil, although serological tests have been available for Q fever for more than five decades, the human disease is not a nationally notifiable disease and its occurrence and geographic distribution in the Brazilian territory are completely unknown, with limited information in the Southeast region<sup>4-6</sup>.

This paper reports an investigation into the source of *C. burnetii* infections in a rural area in the Itaboraí municipality, State of Rio de Janeiro, where the first human case of Q fever in Brazil was confirmed by molecular analysis. In 2008, the patient, after contact with the birth and abortion products of dogs and goats, presented fever with a duration of >40 days that was associated with abdominal pain, headache, nausea, fatigue, malaise and depression. Although the results of the physical examination were unremarkable, except for abdominal pain on palpation, the laboratory investigation revealed a high erythrocyte sedimentation rate, leukocytosis

**Address to:** Dr<sup>a</sup> Maria Angélica Monteiro de Mello Mares-Guia. Lab. de Hantavírus e Rickettsioses/IOC/FIOCRUZ. Av. Brasil 4365, Pavilhão Hêlio e Peggy Pereira, Sala B115, Manguinhos, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Phone: 55 21 2562-1712; Fax: 55 21 2562-1897 e-mail: amguia@ioc.fiocruz.br

Received 22 April 2013

Accepted 28 August 2013

and thrombocytosis, which were associated with significantly higher titers of antibodies to the phase II *C. burnetii* antigen (titers of 1024). Samples from the patient were PCR positive for *C. burnetii* DNA<sup>4</sup>.

**Ethical approval:** Not required. Although Q fever is not a notifiable disease in Brazil, after confirmation that a patient was infected by *C. burnetii*, all the procedures involving animals were performed in the context of the epidemiological surveillance of rickettsiosis in Brazil. The National Reference Laboratory for Rickettsiosis is part of the Laboratory for Hantaviruses and Rickettsiosis.

The study was conducted in December 2008 and March 2009 in the City of Itaboraí (22°44'51" S and 42°51'21" W), Rio de Janeiro State of Brazil. Biological samples from domestic animals were collected in two areas. In area 1, at the patient's property, blood samples were collected from 14 dogs and 3 sheep in 2008. In area 2, at the property to which the goats were subsequently transferred, blood samples from 1 dog, 1 cat, 2 horses and 10 goats as well as milk and vaginal and anal swab samples from goats and fecal samples from the environment were collected in 2009. The serum samples were evaluated for anti-*C. burnetii* antibodies, phases I and II, using a commercial IFA for the detection of IgG (SCIMEDX™, Denville, New Jersey, USA) with a cut-off titer of 64. Blood, milk, vaginal and anal swabs and fecal specimens were evaluated by PCR assay as previously described, using primers targeting the repetitive transposon-like region of *C. burnetii* - Trans1 (5'-TATGTATCCACCGTA GCCAGTC-3') and Trans2 (5'-CCCAACAACACCTCCTTATTC-3') - and producing an expected amplification product of 687 bp<sup>8,9</sup>. DNA was extracted from blood samples from all animals by a QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. DNA from anal/vaginal swabs, after extensive washing in PBS and from milk was extracted using ATL (QIAamp Blood DNA kit, Qiagen™) and proteinase K. Each sample (200 µL) was mixed directly with the ATL and proteinase K and incubated at 56°C overnight, followed by an incubation step for 10min at 70°C<sup>7</sup>. Fecal samples (2g) were mixed with 10ml of PBS and 1ml of chloroform in a 15ml falcon tube with autoclaved beads at the bottom. This mixture was vortexed for 30 min and then centrifuged at 3,390g for 25min. The supernatant (200µL) was treated with proteinase K and ATL buffer for 30min at 70°C, followed by the treatment with AL buffer for 10min at 70°C. The extraction process was continued with a QIAamp DNA blood kit (Qiagen™) following the manufacturer's instructions. Negative controls were included in each extraction to check for possible DNA contamination.

The PCR reaction was performed on 4µL of DNA from each prepared sample in a total volume of 25µL. The final reaction mixture contained 6pmol of each primer (IDT/Prodinol, Belo Horizonte, MG, Brazil), 200µM of dNTPs (20mM of each deoxynucleoside triphosphate), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and nuclease-free water (Promega, Madison, WI, USA). The amplification consisted of an initial denaturation at 95°C for 5min, followed by 40 consecutive cycles of denaturation

at 95°C for 30s, annealing at 60°C for 30s and extension at 72°C for 1min and a final extension at 72°C for 7min.

The PCR products were run on an agarose gel to detect amplification of the target product and then purified using Kit BigDye Terminator® X-Purification (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The sequencing reactions were performed using a BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on an ABI PRISM 3100 Nucleic Acid Sequence Analyzer (Applied Biosystems). Partial sequences were compared with the *hpaAB* gene from *C. burnetii* sequences available in the GenBank database using the BLAST® program<sup>10</sup>.

In area 1, two (15.3%) of the thirteen dogs and two (66.6%) of the three sheep had anti-*C. burnetii* IgG phase II antibodies with a titer of 64. In area 2, only the serum samples from five goats (50%) were reactive (with titers of 64 and 128).

Products of the expected size for the repetitive transposon-like region of *C. burnetii* (687bp) were obtained from blood samples collected from two seronegative dogs in area 1 and from six milk samples and one anal swab from goats in area 2. Two of these six goats were PCR positive but seronegative. The molecular analyses of the fecal samples were negative for *C. burnetii*. Table 1 presents the serological and molecular data from the samples.

The eight nucleotide sequence analyses of the amplicons obtained from the milk and blood samples were compared with other sequences of *C. burnetii* available in the GenBank database and exhibited between 98% and 100% identity with the sequence of the *hpaAB* gene of *C. burnetii* RSA 331 (GenBank accession number CP000890). All sequences obtained in this study were submitted to the NCBI GenBank database, and the accession numbers are shown in Table 1.

This report is the first describing a partial sequence of the *C. burnetii* *hpaAB* gene in domestic animals in Brazil. The DNA sequence of the repetitive transposon-like region generated in this study confirms that *C. burnetii* is circulating in goats and dogs in the rural area of Itaboraí, State of Rio de Janeiro.

The identification of two PCR-positive dogs and two IFA-positive sheep in area 1, after the occurrence of the first confirmed human case of Q fever and the identification of anti-*C. burnetii* antibodies in the family members of the patients and dogs from the patient's property in 2008, demonstrated the persistence of this bacterium in the environment and indicated the risk of further cases of Q fever in this region<sup>4</sup>.

The study performed in area 2, where the goats were transferred months after the occurrence of the Q fever case, identified the infectious agent in the milk and anal swabs from the goats. Because of its stability in the environment and the potential for aerosol dispersion, these results indicated the possibility of an increase in goat-associated *C. burnetii* infections in humans and animals in the City of Itaboraí and its surroundings. Furthermore, as demonstrated by the large outbreaks of Q fever in humans that have been recently described in Europe, where sheep and goats are considered to be the major sources of human exposure to *C. burnetii*<sup>3</sup>, the



TABLE 1 - Serological and molecular analysis of *Coxiella burnetii* in samples from domesticated animals in State of Rio de Janeiro, Brazil.

Area	Animal	IFA (titers)	PCR	GenBank accession number (%) <sup>a</sup>
Area 1	dog 1	unreactive	negative	-
	dog 2	unreactive	negative	-
	dog 3	unreactive	negative	-
	dog 4	unreactive	negative	-
	dog 5	unreactive	negative	-
	dog 6	unreactive	negative	-
	dog 7	unreactive	negative	-
	dog 8	reactive (64)	negative	-
	dog 9	unreactive	negative	-
	dog 10	unreactive	positive <sup>b</sup>	JN966900 (98% identity)
	dog 11	unreactive	negative	-
	dog 12	unreactive	positive <sup>b</sup>	JN966901 (99% identity)
	dog 13	reactive (64)	negative	-
	sheep 1	reactive (64)	negative	-
sheep 2	unreactive	negative	-	
sheep 3	reactive (64)	negative	-	
Area 2	dog1	unreactive	negative	-
	cat	unreactive	negative	-
	horse 1	unreactive	negative	-
	horse 2	unreactive	negative	-
	goat 1	reactive (64)	positive <sup>c</sup>	JN966899 (100% identity)
	goat 2	unreactive	positive <sup>d</sup>	JF968205 (100% identity)
	goat 3	reactive (64)	positive <sup>c</sup>	JF972642 (100% identity)
	goat 4	reactive (128)	negative	-
	goat 5	reactive (64)	positive <sup>c</sup>	JF972643 (100% identity)
	goat 6	unreactive	positive <sup>c</sup>	JF972644 (100% identity)
goat 7	reactive (64)	positive <sup>c</sup>	JN972645 (100% identity)	
goat 8	unreactive	negative	-	
goat 9	unreactive	negative	-	
goat 10	unreactive	negative	-	

<sup>a</sup>(%) maximum similarity with the sequence of the *hipAB* gene of *Coxiella burnetii* RSA 331; <sup>b</sup>serum samples; <sup>c</sup>milk sample; <sup>d</sup>milk sample that was sequenced and anal swab. PCR: polymerase chain reaction; IFA: immunofluorescence assay.

possibility exists that goats were, in fact, the source of the *C. burnetii* infection in the Itaboraí municipality.

Finally, because Q fever is not a notifiable disease and many human cases could have been misdiagnosed as some other infection, the public health impact of *C. burnetii* infection will be not understood until suitable epidemiologic surveillance is effectively employed in Brazil.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are very grateful to the Itaboraí municipality, to the Secretary of the Health of Rio de Janeiro state and to the owners of the areas where the fieldwork was performed for their kind cooperation and assistance during the study.

### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

### FINANCIAL SUPPORT

Partial data were presented at the Tropical Medicine and International Health, European Journal, October 2011, Blackwell Publishing Ltd, 2011; 16 (suppl I):181-182, and as a poster.

### REFERENCES

1. Voth DE, Heinzen RA. Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of *Coxiella burnetii*. *Celular Microbiology* 2007; 9:829-840.
2. Maurin M, Raoult D. Q Fever. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:518-553.
3. Roest HI, Ruuls RC, Tilburg JJ, Nabuurs-Franssen MH, Klaassen CH, Vellema P, et al. Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* from ruminants in Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:668-675.
4. Lemos ER, Rozental T, Mares-Guia MA, Almeida DN, Moreira N, Silva RG, et al. Q fever as a cause of fever of unknown origin and thrombocytosis: first molecular evidence of *Coxiella burnetii* in Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11:85-87.
5. Siciliano RF, Ribeiro HB, Furtado RHM, Castelli JB, Sampaio RO, Santos FCP, et al. Endocardite por *Coxiella burnetii* (febre Q). Doença rara ou pouco diagnosticada? Relato de caso. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 41:409-412.
6. Costa PSG, Brigatte ME, Greco DB. Antibodies to *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Ehrlichia chaffeensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100:853-859.
7. Rodolakis A, Berri M, Héchar C, Caudron C, Souriau A, Bodier CC, et al. Comparison of *Coxiella burnetii* Shedding in Milk of Dairy Bovine, Caprine, and Ovine Herds. *J Dairy Sci* 2007; 90:5352-5360.
8. Rozental T, Mascarenhas LF, Rozenbaum R, Gomes R, Mattos GS, Magno CC, et al. *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever in Brazil: its hidden role in seronegative arthritis and the importance of molecular diagnosis based on the repetitive element IS1111 associated with the transposase gene. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107:695-697.
9. Willems H, Thiele D, Frolich-Ritter R, Krauss H. Detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk using the polymerase chain reaction (PCR). *Zentralblatt für Veterinärmedizin B* 1994; 41:580-587.
10. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215:403-410.

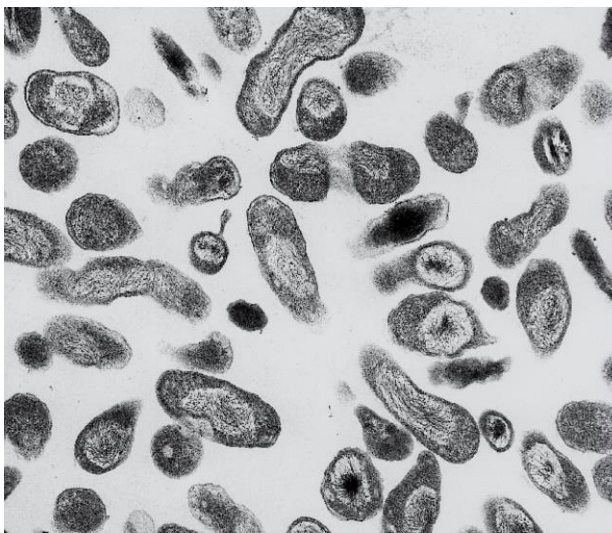
ARTIGO 10.3: Febre Q: uma zoonose esquecida.

SITUAÇÃO DO MANUSCRITO: Publicado na revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária

FATOR DE IMPACTO REVISTA: revista de distribuição em todo o território nacional para médicos veterinários e zootecnistas.

REFERÊNCIA: Maria Angélica Monteiro de Mello Mares-Guia, Elba Regina Sampaio de Lemos

RESUMO: A zoonose causada por *Coxiella burnetii* é amplamente distribuída no mundo e pode ocorrer como surtos ou casos isolados. O amplo espectro de suas manifestações clínicas que podem ir de uma doença febril limitada até uma pneumonia ou endocardite faz do diagnóstico clínico desta doença um grande desafio



## EPIDEMIOLOGIA

# FEBRE Q: UMA ZONOSE ESQUECIDA

*A zoonose causada por *Coxiella burnetii* é amplamente distribuída no mundo e pode ocorrer como surtos ou casos isolados. O amplo espectro de suas manifestações clínicas que podem ir de uma doença febril limitada até uma pneumonia ou endocardite faz do diagnóstico clínico desta doença um grande desafio*

A febre Q é uma zoonose amplamente distribuída e, no Brasil, foi descrita pela primeira vez por Brandão, em 1953. Recebeu atenção internacional na última década, principalmente a partir de 2007, quando mais de 4.000 casos humanos foram confirmados na Holanda e outros surtos foram identificados em diversas regiões do mundo. Ademais, é uma zoonose cosmopolita, descrita pela primeira vez em trabalhadores de abatedouro em Queensland, Austrália, cujo nome faz referência ao termo *query* (febre *query*). É considerada importante problema de saúde pública na Europa, especialmente na Holanda e França, na Austrália e, mais recentemente, no continente norte-americano – onde cerca de 3% da população adulta é sororreativa –, devido ao crescente número de casos notificados (GEORGIEV et al., 2013).

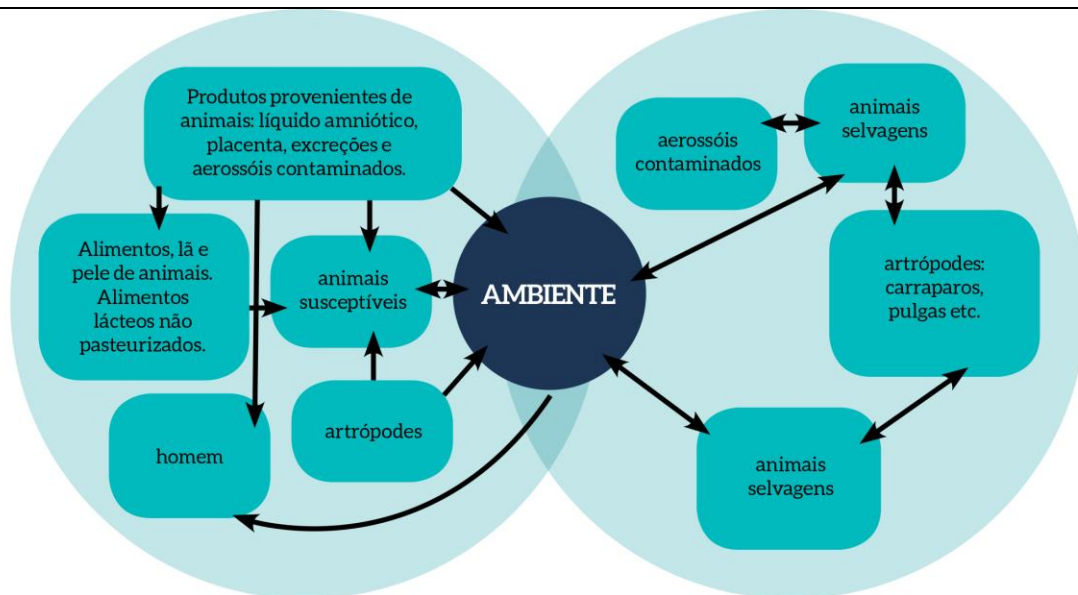
Com vários surtos epidêmicos e relatos de casos em diversas regiões do mundo, tem sido identificada como doença ocupacional, associada com ruminantes, embora, mais recentemente, venha sendo observado o aumento de casos em área urbana, sendo a transmissão relacionada com animais de companhia, como gatos e cães (FOURNIER et al., 1998).

## ETIOLOGIA

A *Coxiella burnetii* é uma pequena bactéria intracelular obrigatória, gram-negativa e pleomórfica. A análise indica que a plasticidade e a redução de seu genoma ainda estão em curso, sugerindo que pode ter uma transição relativamente recente em seu ciclo de vida atual (SESHADRI et al., 2003).

Classificada como agente de bioterrorismo de categoria B pelos Centros de Controle e Prevenção de Doenças, embora não cause elevada mortalidade, se utilizada como arma biológica, em forma de aerossol, tem a capacidade de se dispersar numa linha de 2 km e provocar doença incapacitante aguda (MADARIAGA, 2003).

Na natureza, foram identificados dois ciclos distintos que possibilitam a perpetuação da infecção: o ciclo urbano/rural, com a participação dos animais domésticos, e um segundo, caracteristicamente silvestre, com a participação de marsupiais, roedores, lagomorfos, entre outros, além de alguns ectoparasitas, principalmente carrapatos. Apesar de não terem importância na transmissão para o homem, carrapatos podem desempenhar um papel significativo na transmissão de



▲ **Figura 1.** Inter-relação dos ciclos de perpetuação da infecção na natureza entre animais domésticos e silvestres.

*C. burnetii* entre os vertebrados (Figura 1). Assim, além dos ruminantes, animais de estimação, incluindo gatos, coelhos e cães, têm sido identificados como fontes de surtos urbanos (ANGELAKIS; RAOULT, 2010).

#### PATOGENIA

A via de inoculação em humanos pode determinar, em parte, a manifestação clínica predominante. A pneumonia é a forma mais frequente quando a fonte de transmissão ocorre por aerossóis contaminados. A hepatite granulomatosa passa a ser a manifestação clínica predominante quando a transmissão ocorre por ingestão de leite cru. No homem, a gravidade da febre Q aguda também tem sido associada com a dose do inóculo infectante. Finalmente, fatores do hospedeiro, em especial o estado imunológico do paciente, decorrente de um estado de imunodepressão ou mesmo gravidez, podem influenciar o curso da infecção, incluindo a evolução para doença crônica (MAURIN; RAOULT, 1999).

O aerossol é o principal modo de transmissão para o homem e pode ocorrer diretamente a partir de fluidos provenientes da parturição de animais infectados, contaminando animais recém-nascidos, placenta ou lã. A *C. burnetii* é muito resistente à destruição na natureza, dispersando-se pelo vento e sobrevivendo durante vá-

rias semanas em áreas onde os animais estiveram presentes (MAURIN; RAOULT, 1999). Ingestão, em especial de leite cru, é o fator menos provável na transmissão e, até a presente data, ainda é um ponto de controvérsia, assim como a transmissão de pessoa para pessoa, que é um evento extremamente raro (MAURIN; RAOULT, 1999).

Apesar de a *C. burnetii* ter sido isolada de artrópodes, principalmente carrapatos, é improvável que a transmissão para humanos seja significativa, embora cães possam ser infectados por picada de carrapato. Salienta-se que os vetores biológicos desempenham um papel significativo na transmissão entre os vertebrados silvestres, em particular os roedores, lagomorfos e aves selvagens (ANGELAKIS; RAOULT, 2010). A transmissão sexual foi demonstrada em camundongos infectados (MAURIN; RAOULT, 1999).

#### INFECÇÃO EM HUMANOS

A infecção por *C. burnetii* pode se apresentar com manifestações clínicas agudas ou crônicas. No entanto, quase 60% dos casos são assintomáticos. A maioria dos pacientes sintomáticos experimenta uma doença leve, sem a necessidade de hos-

pitalização. Considerando o amplo e inespecífico espectro clínico, a doença deve ser sistematicamente considerada em pacientes febris com contato recente com animais parturientes (MAURIN; RAOULT, 1999).

#### FEBRE Q AGUDA

Após um período de incubação de duas a três semanas, dependendo do inóculo de *C. burnetii*, o paciente desenvolve um quadro infeccioso agudo caracterizado por febre alta, cansaço, calafrios e cefaleia. Pneumonia atípica é frequente, variando de pneumonia clinicamente assintomática até insuficiência respiratória aguda. A hepatite é outra apresentação frequente, com hepatomegalia clinicamente detectável, mas a icterícia é rara (MAURIN; RAOULT, 1999).

A infecção por *C. burnetii* pode determinar endocardite, osteomielite, febre Q na infância, manifestações neurológicas, exantema, febre de origem obscura, trombocitopenia ou trombocitose reativa (ANGELAKIS; RAOULT, 2010).

#### FEBRE Q CRÔNICA

O diagnóstico de febre Q crônica pode ser estabelecido a partir da persistência da manifestação clínica por mais de seis meses. Ocorre em aproximadamente 5% dos pacientes infectados e pode-se desenvolver insidiosamente meses a anos após a doença aguda (FOURNIER et al., 1998).

Endocardite, infecções vasculares e osteoarticulares, hepatite crônica, infecções pulmonares crônicas, síndrome da fadiga crônica, cronicidade favorecida pela gravidez e prematuridade, e aborto são algumas das apresentações clínicas resultantes da infecção crônica (ANGELAKIS; RAOULT, 2010).

#### INFECÇÃO EM ANIMAIS – “COXIELOSE”

Em contraste com a febre Q aguda humana, a infecção animal é, na maioria dos casos, assintomática, tornando o termo “coxielose” uma designação mais apropriada. Nos animais, durante a fase aguda, a *C. burnetii* pode ser encontrada no sangue, pulmões, baço e fígado, enquanto, durante a fase crônica, há sua liberação persistente nas fezes e urina (ANGELAKIS; RAOULT, 2010).

Além de acometerem muitas espécies animais, incluindo mamíferos, aves e artrópodes, as

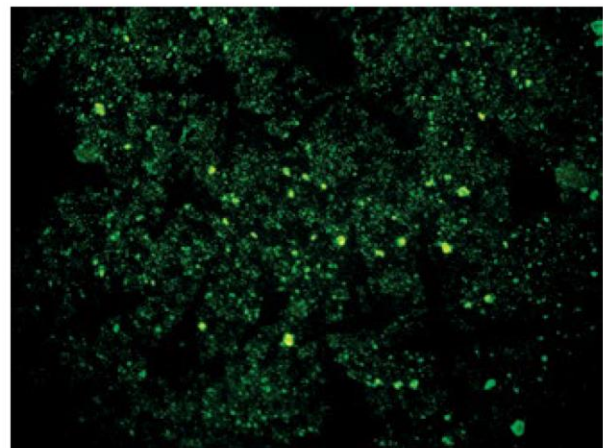
infecções por *C. burnetii* são geralmente assintomáticas, embora nos mamíferos a infecção possa causar abortos e natimortalidade. Os sinais clínicos mais frequentes da infecção podem ser consequentes à pneumonia, aborto, parto de cordeiros e filhotes debilitados. Na maioria dos casos, o aborto ocorre no final da gestação, sem sinais clínicos específicos. Fetos abortados parecem normais, mas placentas infectadas apresentam-se alteradas. A taxa de aborto pode variar de 3% a 80%, embora altas taxas sejam raramente observadas, exceto em alguns rebanhos caprinos. Muitas vezes, o número de fêmeas que abortam no rebanho pode não ser suficiente para alertar o fazendeiro, sendo os casos clínicos humanos que possibilitam identificar a infecção do rebanho (ANGELAKIS; RAOULT, 2010).

Em bovinos, metrite é frequentemente a única manifestação da doença. Mamíferos infectados (ruminantes, gatos, cães, coelhos, pequenos roedores silvestres etc.) liberam *C. burnetii* em produtos provenientes do parto, mas também no leite, urina e fezes (ARRICAU-BOUVER; RODOLAKIS, 2005).

#### DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

##### Diagnóstico sorológico

Uma vez que o diagnóstico clínico é difícil, devido à similaridade com uma série de doenças infecciosas ou não infecciosas, na maioria dos casos o diagnóstico de febre Q é confirmado a partir dos testes sorológicos. Uma variedade de técnicas está disponível, mas o teste de microimunofluorescência indireta tornou-se referência (ANGELAKIS; RAOULT, 2010) (Figura 2).



Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses/Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

▲ **Figura 2** Resultado de teste de microimunofluorescência indireta para *C. burnetii*. 20x.



Fotos dos autores

▲ Coleta de pulgas em gato

Outros métodos incluem imunofluorescência indireta (IFA), microaglutinação, fixação de complemento, radioensaio, teste de hemólise indireta, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), *Enzyme-Linked Immuno Fluorescent Assay* (ELIFA), *dot immunoblotting* e *Western blotting*. Apenas fixação de complemento e IFA estão disponíveis comercialmente (MAURIN; RAOULT, 1999; FOURNIER et al, 1998).

#### Diagnóstico molecular

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido usada com sucesso para detectar DNA de *C. burnetii* em culturas de células e amostras clínicas (ANGELAKIS; RAOULT, 2010).

#### Isolamento bacteriano

A virulência de *C. burnetii* é alta, razão pela qual apenas laboratórios com biossegurança de nível 3 e profissional experiente estão autorizados a manipular amostras clínicas na tentativa de isolamento e cultivo do microrganismo (ANGELAKIS; RAOULT, 2010).

#### Histopatologia associada com imuno-histoquímica

A detecção de *C. burnetii* em tecidos é especialmente informativa em pacientes que estão em tratamento para febre Q crônica. A imunodeteção é realizada usando técnicas de imunoperoxidase ou imunofluorescência com anticorpos mono ou policlonais (ANGELAKIS; RAOULT, 2010; MAURIN; RAOULT, 1999).

#### TRATAMENTO DE ANIMAIS

O uso de tetraciclina na alimentação durante a gravidez não pode ser recomendado como medida de controle em nível de rebanho, devido à baixa biodisponibilidade do fármaco com a administração oral.

O uso de antibióticos, na ausência de abortos em curso, não se justifica. O tratamento individual dos animais (duas injeções de oxitetraciclina, 20 mg/kg, com 20 dias de intervalo), no final da gestação, para prevenir eventos adversos, pode ser útil, embora os dados sejam escassos e inconclusivos. Mesmo que se possam evitar abortos, o tratamento parenteral não parece diminuir a disseminação do organismo em fluidos ao nascimento ou mudar o *status* sorológico (NASPHV; NASAHO, 2013).

#### PROFILAXIA E MEDIDAS DE PREVENÇÃO

Cuidado especial deve ser tomado quando se introduz um novo animal em rebanho livre de febre Q. Simplesmente garantir que o novo animal não está infectado não é suficiente, pois a doença é transmitida principalmente pelo ar. Durante surtos, a contaminação de animais e do meio ambiente pode ser evitada ou reduzida pela destruição de placentas e fetos, evitando sua ingestão por carnívoros domésticos ou selvagens que podem disseminar a bactéria no ambiente. Se possível, os nascimentos devem ser confinados a um local específico, que será desinfetado sem induzir aerossóis (RODOLAKIS, 2009) (Figura 3).

Como em todas as doenças zoonóticas, o controle da doença em animais influencia o nível da doença observada no homem. Estratégias apropriadas de controle de carrapato e boas práticas de higiene podem diminuir a contaminação ambiental. Fluidos e membranas fetais infectados, fetos abortados e camas contaminadas de-

Quadro 4 – Inativação de *C. burnetii* em relação a vários agentes físico-químicos.

TIPO	AGENTE	INATIVAÇÃO
Físico	Temperatura de 65 °C	30 minutos
	Radiações ultravioletas	Resistente
Químico	Formol a 5%	Resistente
	Lisol (5%)	Resistente
	Álcool etílico 70%	30 minutos
	Clorofórmio 5%	30 minutos
	Hipoclorito de sódio 0,5%	Resistente

Fonte: Adaptado de Madariaga (2003).



▲ **Figura 3.** Equipamento de proteção individual com filtro HEPA para ser usado durante coleta de amostras contaminadas por *C. burnetii* em lugares fechados.

vem ser incinerados ou enterrados (Quadro 1). Além disso, o estrume deve ser tratado com cal ou cianeto de cálcio 0,4% antes de ser espalhado sobre os campos, o que deve ser feito na ausência de vento, para evitar a propagação do microrganismo a longas distâncias. Os animais infectados devem ser retirados do rebanho ou colocados em confinamento. Trabalhadores da indústria animal devem ser informados sobre os fatores de risco e os laboratórios devem ser dotados de dispositivos de segurança adequados e equipamentos (ANGELAKIS; RAOULT, 2010).

Ambientes com vazamentos de material potencialmente infeccioso devem ser descontaminados pelo uso de hipoclorito 0,5%, peróxido 5% ou soluções à base de fenol. Resíduos com risco biológico devem ser descontaminados por autoclavagem e os equipamentos/instrumentos contaminados, por desinfetantes, autoclavagem ou fervura (durante dez minutos). A forma esporo-like de *C. burnetii* pode, no entanto, ser resistente à desinfecção normal, ao hipoclorito de sódio, à radiação ultravioleta, assim como ao calor, dessecação, pressão e estresses oxidativo e osmótico (MADARIAGA, 2003).

A pasteurização a 72 °C durante 15 segundos e a esterilização do leite de rebanhos infectados são recomendadas, mesmo que a via oral não seja a principal via de transmissão (ARRICAU-BOUVERY e RODOLAKIS, 2005).

Buhariwalla et al. (1996) chamaram atenção para casos de febre Q transmitidos por gatos e cães domésticos e para a importância da infecção

humana associada com material de aborto ou parto desses animais de companhia.

Três tipos de vacina têm sido propostos para a proteção humana: (i) vacina de *C. burnetii* viva atenuada, produzida e testada na Rússia, mas posteriormente abandonada devido à preocupação com segurança; (ii) vacina de resíduo extraído em clorofórmio-metanol ou outras vacinas extraídas (testadas em animais, mas não em seres humanos); (iii) vacina inativada por formalina de célula inteira (Q-Vax), considerada aceitável e segura para ser utilizada em seres humanos (ANGELAKIS; RAOULT, 2010). A Q-Vax tem sido utilizada na Austrália e estudos realizados de 1981 a 1989, em 4.000 indivíduos, concluíram que fornece proteção completa e duradoura, evitando casos graves. Provoca apenas reações menores, incluindo edema e hiperemia no local de inoculação (MADARIAGA, 2003), mas até o momento não está disponível no Brasil. ●

## REFERÊNCIAS

- ANGELAKIS, E.; RAOULT, D. Review Q fever. *Veterinary Microbiology* v.140, p.297-309, 2010.
- ARRICAU-BOUVERY, N.; RODOLAKIS, A. Is Q Fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Veterinary Research* v.36, p.327-349, 2005.
- BUHARIWALLA, F.; CANN, B.; MARRIE, T.J. A Dog-Related Outbreak of Q Fever. *Clinical Infectious Diseases* v.39, n.4, p.753-755, 1996.
- FOURNIER, P.E.; MARRIE, T.J.; RAOULT, D. Minireview Diagnosis of Q Fever. *Journal of Clinical Microbiology* v.36, p.1823-1834, 1998.
- GEORGIEV, M.; AFONSO, A.; NEUBAUER, H. et al. Q fever in humans and farm animals in four European countries, 1982 to 2010. *Euro Surveill.* v.18, n.8, p.204-207, 2013.
- MADARIAGA, M.G.; REZAI, K.; TRENHOLME, G.M. et al. Q fever: a biological weapon in your backyard. *The Lancet Infectious Diseases* v.3, n.11, p.709-721, 2003.
- MAURIN, M.; RAOULT, D. Q Fever. *Clin. Microbiol. Ver.* v.12, n.4, p.518-53, 1999.
- National Association of State Public Health Veterinarians and National Assembly of State Animal Health Officials. *Prevention and Control of Coxiella burnetii Infection among Humans and Animals: Guidance for a Coordinated Public Health and Animal Health Response*, 2013. [cited 2015]. Available from: [http://www.nas-phv.org/Documents/Q\\_Fever\\_2013.pdf](http://www.nas-phv.org/Documents/Q_Fever_2013.pdf)
- RODOLAKIS, A. Q Fever in Dairy Animals. Rickettsiology and Rickettsial Diseases-Fifth International Conference: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* v.1166, p. 90-93, 2009.
- SESHADRI, R.; PAULSEN, I.T.; EISEN, J.A. et al. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* v.100, n.9, p5455-5460, 2003.

## AUTORAS

**Maria Angélica Monteiro de Mello Mares-Guia**  
Médica Veterinária  
CRMV-RJ nº 9768  
Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)  
[angelicamguia@terra.com.br](mailto:angelicamguia@terra.com.br)

**Elba Regina Sampaio de Lemos**  
Médica Infectologista  
Chefe do Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses do IOC/Fiocruz



ARTIGO 10.4: Clinical and epidemiological use of *Nested* PCR targeting the repetitive element IS1111 associated with the transposase gene from *Coxiella burnetii*.

SITUAÇÃO DO MANUSCRITO: Artigo preparado para submissão para a revista Journal of Microbiological Methods

FATOR DE IMPACTO REVISTA: 2.096

REFERÊNCIA: Maria Angélica Monteiro de Mello Mares-Guia, Tatiana Rozental, Alexandro Guterres, Michelle dos Santos Ferreira, Elba Regina Sampaio de Lemos

RESUMO: Febre Q é uma zoonose mundial causada por *Coxiella burnetii*, uma pequena bactéria gram-negativa intracelular obrigatória encontrada numa variedade de animais. É transmitida ao ser humano por inalação de aerossóis contaminados de urina, fezes, leite, líquido amniótico, placenta, produtos de aborto, lã e raramente pela ingestão de leite cru de animais infectados. O diagnóstico definitivo da febre Q é baseado principalmente na sorologia e, menos comumente por reação em cadeia da polimerase (PCR). Este trabalho apresenta a aplicação de ensaio *Nested* PCR, utilizando como alvo gene os elementos IS1111 transposase no genoma de *C. burnetii* em comparação com pesquisa de anticorpos e de PCR convencional para a detecção de infecção de *C. burnetii* em amostras humanas e veterinárias. Os anticorpos contra *C. burnetii* foram investigados em amostras de soro de 24 pacientes e 71 animais domésticos usando imunofluorescência indireta técnica de ensaio com valor de corte de 64. PCR convencional e *Nested* foram usadas para testar amostras biológicas de casos suspeitos de febre Q em coágulo, tecido, amostras de leite e swab anal e vaginal dos animais. Infecção de *C. burnetii* foi confirmada por *Nested* PCR em 2 pacientes seronegativos e outras amostras de 5 animais seronegativos. O ensaio de *Nested* PCR possibilitou a detecção de infecção por *C. burnetii* em um maior número de amostras do que a PCR convencional e com níveis extremamente baixos de DNA..

**Clinical and epidemiological use of Nested PCR targeting the repetitive element IS1111 associated with the transposase gene from *Coxiella burnetii***

Maria Angélica M.M. Mares-Guia<sup>✉,1</sup>, Alexandro Guterres,<sup>1</sup> Tatiana Rozental,<sup>1</sup> Michelle dos Santos Ferreira<sup>1</sup>, Elba R.S. Lemos<sup>1</sup>.

**Author affiliations:** 1.Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

✉ **Corresponding author:** Maria Angélica M.M. Mares-Guia, Pavilhão Hélio e Peggy Pereira, sala B115, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Avenida Brasil 4365, Manguinhos, 21040-900, Rio de Janeiro/RJ, Brazil. Phone number: 5521-2562-1712, Fax number: 5521-2562-1897, Email:amguia@ioc.fiocruz.br

**ABSTRACT**

Q fever is a worldwide zoonosis caused by *Coxiella burnetii*, a small obligate intracellular gram-negative bacteria found in a variety of animals. It is transmitted to human being by inhalation of contaminated aerosols from urine, feces, milk, amniotic fluid, placenta, abortion products, wool and rarely by ingestion of raw milk from infected animals. Definitive diagnosis of Q fever is mainly based on serology and less commonly by polymerase reaction chain (PCR). This report presents the application of *Nested PCR* assay using as target part of the gene IS1111 transposase elements in the genome of *C. burnetii* in comparison with antibody research and conventional PCR for the detection of *C. burnetii* infection in human and veterinary samples. Antibodies against *C. burnetii* were investigated in serum samples of 24 patients and 71 domestic animals using indirect immunofluorescence assay technique with

cut-off value of 64. Conventional and nested PCR were used to assay biological specimens from suspected Q fever cases and clot, tissue, milk samples and anal and vaginal swab from the animals. *Coxiella burnetii* infection was confirmed by nested PCR in 2 seronegative patients and other samples of 5 seronegative animals. The nested PCR assay aimed to identify a higher number of *C. burnetii* infection among the evaluated samples, detecting DNA at extremely low levels. In conclusion, the nested PCR developed for this study was found to be a highly sensitive and specific diagnostic tool for *C. burnetii* active infection.

## 1. INTRODUCTION

Q fever is a worldwide zoonosis caused by *Coxiella burnetii*, a small obligate intracellular bacteria and gram-negative pleomorphic Legionellales order (Fournier et al.,1998). Its great persistence in the environment for long periods and remaining infectious along with its resistance to chemical and physical factors are one of its important attributes. Furthermore the infection is known in a variety of other animals, including other species of ruminants, domestic and wild animals, birds and arthropods, especially ticks. Cattle, sheep and goats are the primary reservoirs of *C. burnetii* (CDC 2015, Angelakis & Raoult 2010, Fenollar et al. 2004, Maurin and Raoult 1999). Transmission to humans usually occurs through inhalation of contaminated aerosols from urine, feces, milk, amniotic fluid, placenta, abortion products, wool or less commonly by ingestion of raw milk from infected animals (CDC 2015, Maurin and Raoult 1999).

Although there are several ways of detection of *C. burnetii*, DNA by PCR-based methods has been used for diagnosis of Q fever including conventional PCR, nested PCR, real-time PCR or LAMP assay (Chen & Ching 2014, Angelakis & Raoult 2010, Klee et al. 2006). Despite various methods based on qPCR prove helpful, we cannot doubt the validity of conventional

PCR mainly for its low cost and the possibility of sequencing larger sizes of amplicon if not there is a need to quantify. Berri et al. (2000) showed that the sensitivity of the Trans-PCR was 100 times greater than the sensitivity obtained by PCR using "primer" CB1-CB2. The objective was to increase the sensitivity of the Trans-PCR primer using a nested PCR assay. This work aimed to increase the sensitivity of the Trans-PCR primer, using a nested PCR assay, besides to evaluate its applicability in different species of animals and different types of samples.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 CLINICAL SAMPLES AND DNA EXTRACTION

Samples of 24 patients suspect from Q fever during 2013 and 71 domestic animals from Rio de Janeiro, Brazil were tested using indirect immunofluorescence assay technique with cut-off value of 64. Conventional and nested PCR were used to assay biological specimens from suspected Q fever cases and clot, tissue, milk samples and anal and vaginal swab from the animals was extracted. In addition, tissue samples from rodents were also tested to conventional and nested PCR.

DNA was extracted from different animals like goats, sheep, rodents, dogs and cats. The human DNA extraction samples were serum and clot. Several types of samples were tested as serum, clot, tissue, milk, tick, anal and vaginal swab using a QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA), according to the instruction manual. DNA from anal/vaginal swabs, after extensive washing in PBS and from milk was extracted using ATL (QIAamp Blood DNA kit, Qiagen TM) and proteinase K. Each sample (200 µL) was mixed directly with the ATL and proteinase K and incubated at 56°C overnight, followed by an incubation step for 10min at 70°C (Mares-Guia et al 2014, Rodolakis et al 2007) followed by the treatment with AL buffer for 10min at 70°C. The extraction process was continued with a

QIAamp DNA blood kit (QIAamp Blood DNA kit, Qiagen TM) following the manufacturer's instructions. Negative controls were included in each extraction to check for possible DNA contamination.

## 2.2 OBTAINING AND PURIFICATION OF DNA *COXIELLA BURNETII*

*C. burnetii* Nine Mile phase I and II, fixed blade and tested by indirect immunofluorescence assay (IFA) using a serum from the acute Q fever patient and FITC conjugated anti-human IgG antibody (SCIMEDX™, Denville, New Jersey, USA) was used dilute with PBS. DNA was extracted from this solution with 200 µl by using a QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) following the manufacturer's instructions. It is then quantified and used as positive control (0.034 µg / ml - quantified in Qubit© fluorometer) for the first PCR and serial dilutions were made tenfold for the detection limit.

## 2.3 PCR ASSAY

Using the pair of primers that target the gene *IS1111* transposase elements in the genome of *C. burnetii* (Willems et al.1994, Houver et al. 1992) and the expected product of amplification of the target sequence with these primers was 687 bp in length. The pair of primers Trans1 (5'TAT GTA TCC ACC GTA GCC AGT C-3') and Trans2 (5'-CCC AAC AAC ACC TCC TTATTC-3') was submitted a PCR reaction that was performed on 4 µl of each prepared sample in a total volume of 25 µl. The final reaction mixture contained 1x PCR buffer 10x, 0.2 µM of each "primer" (RTD / Prodimol, Belo Horizonte, MG, Brazil), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP mix (20 mM of each deoxynucleotide triphosphate), 0.5U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 4 uL of DNA sample and nuclease free water (Promega, Madison, WI, USA). Amplification was performed in a 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and consisted of initial denaturation at 95°C for

5 min, followed by 40 successive cycles of denaturation at 95 ° C for 30s, annealing at 60 ° C for 30s and extension at 72 ° C for 1 min. It was followed by a final extension of 7 min at 72 ° C. All steps used negative controls to control contamination

## 2.4 NESTED PCR ASSAY

### 2.4.1 STANDARDIZATION AND GRADIENT

Using a primers of the Trans-PCR for 1<sup>st</sup> PCR, and N3+ (5'- AAG CGT GTG GAG GAG CGA ACC-3') and N4- (5'- CTC GTA ATC ACC AAT CGC TTC GTC-3') for 2<sup>nd</sup> PCR designed from the gene *IS1111* transposase elements in the genome of *C. burnetii* (Willems et al.1994, Houver et al. 1992) and the expected product of amplification of the target sequence with these primers was 440 bp in length. A total of 25 µl of mixture contained 2 µl of DNA samples (2 µl of 1<sup>st</sup> PCR reaction mixture in 2<sup>nd</sup> PCR). The final reaction mixture contained 1x PCR buffer 10x, 0.2 µM of each "primer" (RTD / Prodimol, Belo Horizonte, MG, Brazil), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP mix (20 mM of each deoxynucleotide triphosphate), 0.5U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A gradient PCR amplification was performed in a thermocycler (Applied Biosystems Veriti 96) and consisted of initial denaturation for 5 min at 95 ° C followed by 30 successive cycles of denaturation at 95 ° C for 30 s, annealing in a gradient of 65 ° C / 66 ° C / 67 ° C / 68 ° C / 69 ° C / 70 ° C for 30s and extension at 72 ° C for 1 min. It was followed by a final extension of 5 min at 72 ° C. To confirm amplification, the products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose gel stained with GelRed <sup>TM</sup> solution (Biotium, Hayward, CA, USA). Was used as a molecular weight marker 100bp DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and the amplified products were visualized under UV light transilluminator were stored in digital system for gel documentation (Carestream GelLogic System) to select the annealing temperature. Thus, the selected reaction was the initial denaturation for 5 min at 95 ° C followed by 30 successive

cycles of denaturation at 95 ° C for 30 s, annealing at 66 ° C for 30 s and extension at 72 ° C for 30s, followed by a final extension to 72 ° C for 5 min.

## 2.5 SENSITIVITY OF PCR AND NESTED PCR ASSAYS

Vero cell *Coxiella burnetii* are solubilized with Buffers PBS were extracted from 200 µl using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) following the manufacturer's instructions. After extraction of total DNA was quantified using in Qubit® fluorometer used as positive control 0.034 µg / ml. Solutions of purified *C. burnetii* were prepared ranging from 1 until 10<sup>7</sup> dilutions. Dilutions were made from 2 µl of the solution extracted with 18 µl of nuclease-free water and so on until to 1x 10<sup>7</sup> dilution. Four µl of the DNA solution were used in the PCR and 2 µl for nested PCR assays.

## 2.6 SPECIFICITY OF PCR AND NESTED PCR ASSAYS

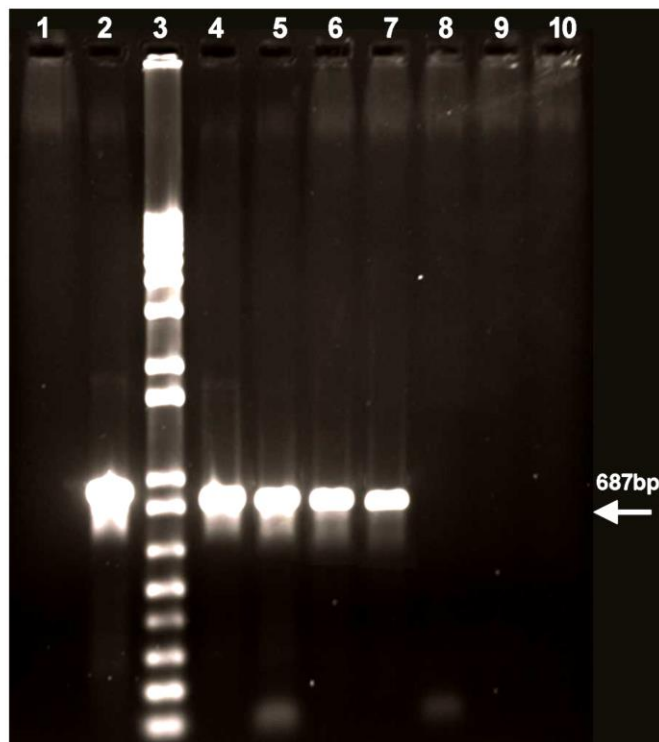
DNA samples of *C. burnetii* and 15 other bacteria were used in the PCR and the nested PCR assays in order to evaluate specificity. The bacteria used in the experiments were *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Bartonella henselae*, *Borrelia burgdorferi* (Laboratório de Hantavíroses e Rickettsiose, FIOCRUZ), *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00025 (ATCC 15442), *Brucella abortus* INCQS 00242 (ATCC 7705), *Legionella pneumophila subsp pneumophila* INCQS 00451 (NCTC 11232 ATCC 33155), *Staphylococcus aureus* CCBH 3853 (ATCC 25923), *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* e *Listeria monocytogenes*.

## 3. RESULTS

### 3.1 SENSITIVITY OF THE PCR AND NESTED PCR ASSAYS

Sensitivity was compared between the PCR and the nested PCR assays in the detection of *C. burnetii* DNA. The PCR assay with the Trans-PCR primers for 1<sup>st</sup> PCR detected until 10<sup>4</sup> dilution (figure 1).

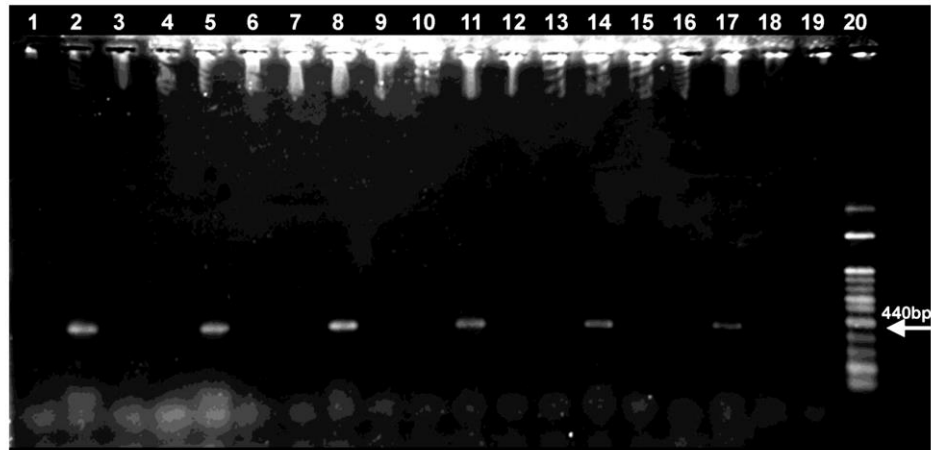
Figure 1: PCR assay with *Coxiella burnetii* performed with primers of Trans-PCR as described in Material and Methods. Lanes; 1, negative control; 2, *C. burnetii* suspension 1x; 3, 100 bp DNA ladder; 4, *C. burnetii* suspension 10x; 5, *C. burnetii* suspension 10<sup>2</sup>x; 6, *C. burnetii* suspension 10<sup>3</sup>x; 7, *C. burnetii* suspension 10<sup>4</sup>x; 8, *C. burnetii* suspension 10<sup>5</sup>x; 9, *C. burnetii* suspension 10<sup>6</sup>x; 10, *C. burnetii* suspension 10<sup>7</sup>x.



Based on the results of first PCR annealing temperature gradients were made to negative solutions either 10<sup>5</sup> to 10<sup>7</sup> (figure 2).

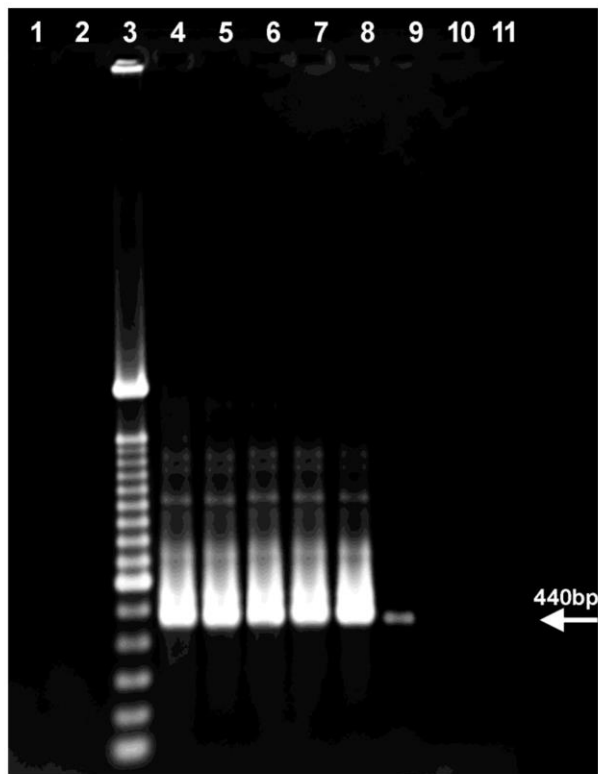


Figure 2: PCR assay with *Coxiella burnetii* annealing temperature gradients. . Lanes; 1, negative control; 2 -4, *C. burnetii* suspension  $10^5$ x to  $10^7$ x at 65°C; 5-7, *C. burnetii* suspension  $10^5$ x to  $10^7$ x at 66°C; 8-10, *C. burnetii* suspension  $10^5$ x to  $10^7$ x at 67°C; 11-13, *C. burnetii* suspension  $10^5$ x to  $10^7$ x at 68°C; 14-16, *C. burnetii* suspension  $10^5$ x to  $10^7$ x at 69°C; 17-19, *C. burnetii* suspension  $10^5$ x to  $10^7$ x at 70°C; 20, 100 bp DNA ladder.



Whereas the nested PCR assay with pair of primers, N3+ and N4-, detected until the dilution  $10^5$ , indicating that the nested PCR assay was 10 times more sensitive than the PCR assay (figure 3). Thus, the selected reaction was the initial denaturation for 5 min at 95 °C followed by 30 successive cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 66 °C for 30 s and extension at 72 °C for 30s, followed by a final extension to 72 °C for 5 min.

Figure 3: PCR assay with *Coxiella burnetii* performed with primers of Nested as described in Material and Methods. Lanes; 1, negative control PCR1; 2 negative control PCR2; 3, *C. burnetii* suspension 1x; 4, 100 bp DNA ladder; 5, *C. burnetii* suspension 10x; 6, *C. burnetii* suspension  $10^2$ x; 7, *C. burnetii* suspension  $10^3$ x; 8, *C. burnetii* suspension  $10^4$ x; 9, *C. burnetii* suspension  $10^5$ x; 10, *C. burnetii* suspension  $10^6$ x; 11, *C. burnetii* suspension  $10^7$ x.



### 3.2 SPECIFICITY OF PCR AND NESTED PCR ASSAYS

The DNA samples from 15 other bacteria that were used in PCR1 and Nested PCR assays to assess the specificity showed no amplification for these microorganisms which highlights the specificity of primes.

### 3.3 DETECTION OF *C. BURNETII* DNA FROM CLINICAL SPECIMENS

DNA was extracted from serum and clot sample from 24 suspected Q fever patient and were tested for *C. burnetii* DNA by the PCR and the nested PCR assays. From the 18 sheep tested 4 were reactive but 1 was reactive and positive in PCR (positive in tissue sample). From 27 dogs 3 was reactive but 2 was non reactive and positive in PCR (positive in serum sample).

From 10 goats 5 was reactive but 4 were was reactive and positive in PCR (positive in milk sample), 2 was non reactive and positive in PCR (positive in milk sample and one anal swab). From 14 cats 3 was reactive but 1 was non reactive and positive in PCR (positive in anal swab). Two patients, spleen tissue sample from rodents and tick (Table 1) were only positive in nested and were therefore sequenced and deposited the partial sequences in the GenBank.

Table1: Partial sequences of the gene *IS1111* transposase elements in the genome of *C. burnetii* at the GenBank from samples.

registro	Animal / Patient	species	source material	Trans 1-2	N3+/N4-	GenBank accession number a (%); b(%)	Size
LRP0814/13	Patient 1	human	clot sample	N	P	KP645185 a(100%); b(100%)	437 bp
LRP1022/13	Patient 2	human	clot sample	N	P	KR091975 a(100%); b(100%)	409 bp
LBCE13257	<i>Akodon cursor</i> 1	rodent	spleen tissue	N	P	KT965026 a(100%); b(100%)	432bp
LBCE13265	<i>Oxymycterus dasythricus</i>	rodent	spleen tissue	N	P	KT965027 a(100%); b(100%)	439bp
LBCE11866	<i>Akodon cursor</i> 2	rodent	spleen tissue	N	P	KT965028 a(100%); b(100%)	438bp
LBCE11871	<i>Akodon sp.</i>	rodent	spleen tissue	N	P	KT965029 a(100%); b(100%)	438bp
LBCE11914	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	rodent	spleen tissue	N	P	KT965030 a(99%); b(100%)	326bp
LBCE11924	<i>Mus musculus</i>	rodent	spleen tissue	N	P	KT965031 a(100%); b(100%)	440bp
C59	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	tick	tick	N	P	KT867378 a(100%); b(100%)	370 bp
C154	<i>Amblyomma sculptum</i>	tick	tick	N	P	KT970067 a(99%); b(99%)	439 bp

a(%) maximum similarity with the sequence of the *IS1111* gene of *Coxiella burnetii* RSA 331  
b(%) query cover with the sequence of the *IS1111* gene of *Coxiella burnetii* RSA 331

Other types of samples such as milk sample, vaginal wab, tissue and serum samples positive in the same trans-PCR were sequenced from nested. These samples were from different animals like goat (JN966899 - 430 bp), sheep (KC854154 - 373 bp), cat (KC854155 - 394 bp) and human. These sequences were deposited in GenBank

## DISCUSSION

The PCR has been used widely for the diagnosis of infectious diseases, including those caused by *C. burnetti*. The Hemi-nested and nested PCR increases PCR sensitivity and leads to at least a 10.000 fold enhancement of the correct PCR product over nonspecific products that could be co-amplified when using outer primers only. The amount of PCR product used in the nested PCR should be adjusted accordingly based on the results of the first PCR. In future diagnostic work all samples should be tested with nested primers regardless of the first PCR result. False negative results after the first PCR could occur due to a very small number of copies present in the specimen (Watzinger, et al, 2006; Klein, 2002). The objective of this study was to design and implement the nested PCR for a target gene that was already proven previously (Berri et al. 2000, Willems et al.1994, Houver et al. 1992) with enough specificity and sensitivity. With these new internal primers for Trans-PCR primers proved a 10x increased sensitivity and a partial sequence with excellent 440bp size to sequence. Although several real-time PCR techniques are proven sensitive to the opportune diagnosis (Angelakis & Raoult 2010, Klee et al. 2006), this study aimed to find an alternative to conventional PCR. Conventional PCR is a low cost technique and can be used for few samples free of charge. Although the work of Chen et al (2014) is also proposes novel detection for serum samples while nested can be used in different types of samples such as milk, swabs and tissues. The possibility of amplifying and sequencing partial sequences that certainly does not align with other microorganisms and having a good size 440bp, makes this pair of primers a great alternative for qPCR. In our experiments we could amplification of different samples without any occurrence of non-specific band. It was also to samples of different hosts and different types and improve of amplified material the specificity of the amplified test. Whereas currently the gold standard for definition of case and the immunofluorescence test with our

results we found that in the initial phase becomes easier to detect positives with PCR and improving with nested. In animals, for surveillance found that identify positive cases other sample types rather than in the blood which makes a valuable technique for these cases. We conclude that this may be a good alternative for the diagnosis of *Coxiella burnetii*.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Bacterial DNA were kindly provided by Ivano de Filippis, Collection Reference Microorganisms in Health Surveillance, CMRVS Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Brazil

#### REFERENCE

- Angelakis E, Raoult D 2010. Review Q fever. *Veterinary Microbiology* 140: 297–309.
- Berri M, Laroucau K, Rodolakis A 2000. The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology* 72: 285-293.
- Chen HW, Ching WM. Development of loop-mediated isothermal amplification assays for rapid and easy detection of *Coxiella Burnetii* 2014. *Journal of Microbiological Methods* 107:176–181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2014.07.039>
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2015. Q fever. Access: <http://www.cdc.gov/qfever/symptoms/index.html>
- Fenollar F, Fournier PE, Raoult D. Molecular Detection of *Coxiella burnetii* in the Sera of Patients with Q Fever Endocarditis or Vascular Infection. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(11): 4919–4924

- Fournier PE, Marrie TJ, Raoult D. Minireview Diagnosis of Q Fever. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36: 1823–1834.
- Hoover TA, Vodkin MH, Williams J 1992. A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. *Journal of Bacteriology* 174: 5540–5548.
- Klein, D., 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol. Med.*, [http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4914\(02\)02355-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4914(02)02355-9)
- Klee SR, Tyczka J, Ellerbrok H, Franz T, Linke S, Baljer G, Appel B 2006. Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. *BMC Microbiology*. 6:2 doi:10.1186/1471-2180-6-2.
- Maurin M, Raoult D. Q Fever. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(4): 518–53.
- Mares-Guia MAMM, Rozental T, Guterres A, Gomes R, Almeida DNP, Moreira NS, Barreira JD, Favacho ARM, Santana AL, Lemos ERS 2014. Molecular identification of the agent of Q fever – *Coxiella burnetii* – in domestic animals in State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 47:231–234
- Rodolakis A, Berri M, Héchard C, Caudron C, Souriau A, Bodier CC, et al. 2007. Comparison of *Coxiella burnetii* Shedding in Milk of Dairy Bovine, Caprine, and Ovine Herds. *J Dairy Sci*; 90:5352-5360.
- Watzinger, F., Ebner, K., Lion, T., 2006. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Mol. Asp. Med.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.001>

## 11. ATIVIDADES ACADÊMICAS E OUTRAS PUBLICAÇÕES

### 11.1. OUTRAS PUBLICAÇÕES

Missailidis S, Godoy DT, Mares-Guia MAMM, Favacho ARM and Lemos ERS. 2014. Current and Future Trends in the Clinical Diagnosis of Rickettsioses *Sensu Lato*. International Journal of Tropical Disease & Health 4(2): 147-181.



**International Journal of TROPICAL DISEASE  
& Health**  
4(2): 147-181, 2014

SCIENCEDOMAIN *international*  
www.sciencedomain.org



---

## Current and Future Trends in the Clinical Diagnosis of Rickettsioses *Sensu Lato*

S. Missailidis<sup>1\*</sup>, D. T. Godoy<sup>1</sup>, M. A. M. M. Mares-Guia<sup>1</sup>,  
A. R. M. Favacho<sup>1</sup> and E. R. S. Lemos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório of Hantaviruses and Rickettsioses, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ,  
Rio de Janeiro, Brazil.

**Authors' contributions**

*This work was carried out in collaboration between all authors. Authors SM and DTG contributed equally and share first authorship. All authors read and approved the final manuscript.*

**Review Article**

**Received 17<sup>th</sup> July 2013**  
**Accepted 14<sup>th</sup> September 2013**  
**Published 20<sup>th</sup> November 2013**

---

### ABSTRACT

**Aims:** The aim of this review is to present Rickettsioses *sensu lato*, with emphasis on their current and future clinical diagnosis. The review presents the conditions, the agents that cause them, and the current gold standards on their diagnosis in national and international reference centres. Additionally, this review covers the various emerging technologies available in the diagnosis of Rickettsioses and discusses their potential for future use as gold standards in the diagnosis of these diseases.

**Introduction:** The introduction presents Rickettsioses *sensu lato* and gives a broad overview of the conditions they cause, the issues associated with their current diagnosis and the need for their improved, earlier and more accurate diagnosis, in order to prevent current issues with false negatives, misdiagnosis or delay in the diagnosis associated with these conditions, which often renders them grave or lethal.

**Main Body:** The main body of the review presents in independent sections Rickettsias, Ehrlichia, Anaplasma, Bartonella and Coxiella and the conditions associated with each of these bacteria. Spotted fever, endemic typhus, human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis, bartonellosis and Q-fever are some of the conditions associated with this group of proteobacteria. The emphasis is on the clinical diagnosis of these conditions and an overview of the current practice, gold standards in reference

---

\*Corresponding author: Email: sotiris.missailidis@ioc.fiocruz.br;

112

laboratories and improvements in these methodologies is presented. The last part of the review focuses on novel technologies in bacterial detection and their application specifically on Rickettsioses *sensu lato*, demonstrating how these technologies are being applied in this field and how they could improve current standards and resolve issues associated with the clinical diagnosis of rickettsioses.

**Conclusion:** Rickettsioses *sensu lato* are conditions associated with proteobacteria historically included in the Rickettsiaceae family, able to cause a number of conditions, often grave or lethal. One of the major issues associated with poor clinical outcome is the lack of early and accurate differential diagnostic methodologies. Current methods, including serological and molecular biology techniques have various advantages and disadvantages, which new technologies available or currently in development may be in a position to resolve and the issues associated with the institution of such technologies.

*Keywords:* Rickettsia; Ehrlichia; Anaplasma; Bartonella; Coxiella; clinical diagnosis.

## 1. INTRODUCTION

Significant advances in bacterial detection and clinical diagnosis of bacterial diseases have been achieved in the last decade and have opened the path for future developments. However, a lot of bacterial diseases remain misdiagnosed and, despite advances in antibiotics and the availability of curative interventions, they can often lead to serious conditions and death, with diagnosis arriving in very late stages or even post-mortem. One such group of bacteria, where methods for accurate and early diagnosis remain necessary are the "rickettsias *sensu lato*", here referred to as proteobacteria historically included in the Rickettsiaceae family, before phylogenetics investigations that placed genera *Bartonella* and *Coxiella* in other taxonomic subdivisions [1,2]. Besides these, the genus *Orientia*, causing scrub typhus, has recently been removed from the genus *Rickettsia* and classified as a separate genus in the Rickettsiaceae family. *Orientia* is shown to be endemic in eastern Asia and western Pacific, and is transmitted by mites, and is thus not included in this review, as is not *Neorickettsia* and *Wolbachia*.

Various diseases are attributed to "rickettsias *sensu lato*", including rickettsioses of the spotted fever group (SFG), recrudescent typhus, typhus transmitted by cat fleas, rickettsioses varicelliform, ehrlichiosis, Q fever and bartonellosis, transmitted by arthropods, like mites, ticks, lice and fleas, and are found in many parts of the world. *Rickettsia* and *Ehrlichia* genus are  $\alpha$ -proteobacteria of the subgroup 1 and *Bartonella* of the subgroup 2, whereas *Coxiella burnetii* belongs to the  $\gamma$ -proteobacteria. Although initially the above species all belonged to the order *Rickettsiales*, family *Rickettsiaceae*, they are now reorganised and considered as individual families of bacteria. The family *Bartonellaceae*, as well as *Coxiella burnetii*, were removed from the order *Rickettsiales*, which includes now two families, the *Anaplasmataceae* and *Rickettsiaceae*. However, they are often still studied within the field of rickettsiology and for the purpose of this review we will consider them jointly, particularly due to the many common characteristics they present, both in the way they are transmitted and in many of the symptoms they cause [1,2].

Rickettsioses, especially SFG, are often misdiagnosed for other endemic diseases, such as dengue fever or leptospirosis, in tropical countries and, thus, often result in grave or fatal outcome [3-5]. This in part is due to the similarity of symptoms with other common endemic diseases, but also in part due to the nature of the diagnostic assays currently employed as gold standards in the diagnosis of these conditions, based on serological assays for the



presence of patient antibodies against these bacteria. As patient antibodies, IgG or IgM, can take up to two weeks to appear, early serological examination may lead to false negative results and two evaluations are necessary. Yet, until the second evaluation takes place to confirm seropositivity, symptoms may have advanced significantly. Thus, in this review, we are looking at "rickettsias *sensu lato*", including, besides the genus *Rickettsia*, the *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Bartonella* and *Coxiella* genus with a focus on the current diagnostic standard and an evaluation of future trends and their applicability and viability as laboratory methods that could have a wider application in the early and accurate diagnosis of these bacterial infections.

## 2. RICKETTSIOSES CAUSED BY THE GENUS *RICKETTSIA* AND THEIR DIAGNOSIS IN HUMANS

Rickettsioses are zoonoses caused by obligate intracellular bacteria of the genus *Rickettsia* in the order *Rickettsiales*. Rickettsias are Gram-negative, non-motile bacteria, with endothelial cells as their primary target. Their life cycle involves arthropod vectors like ticks, fleas, lice and mites [6]. Members of this genus may be classified into four groups: (i) typhus group (TG), which includes *Rickettsia typhi* and *Rickettsia prowazekii*; (ii) spotted fever group (SFG), based mainly on phenotypic and serological features with more than 25 different species including *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia africae*, and *Rickettsia parkeri*; (iii) ancestral Rickettsiae group, which includes *Rickettsia belli* and *Rickettsia canadensis* and (iv) transitional group, with *Rickettsia akari*, *R. australis* and *R. felis* [7-10].

Rickettsial pathogens are widely distributed throughout the world, causing emerging and re-emerging infectious diseases. These zoonoses are among the oldest known vector-borne diseases. Their global distribution varies according to the density and distribution of the arthropod vector and the population density of the reservoir hosts [6,11]. SFG are increasingly being identified among international travellers. Two percent of imported fevers are caused by rickettsioses and 20% of these patients are hospitalized [12].

The case definition of confirmed SFG includes both clinical evidence and laboratory confirmation. The clinical features of this rickettsiosis consist of an acute undifferentiated febrile illness, often accompanied by headache, myalgia and nausea, and a maculopapular or vesicular rash may be observed a few days after the onset of illness [13-15]. When a patient develops a febrile illness, the suspicion for tick-borne illness should be high in those who live or travel to endemic areas. Outdoor activities, whether recreational or occupational, particularly in areas with high-uncut grass, weeds, and low brush, can increase the risk for tick bites and thus the chance for disease onset [16].

Clinical disease develops prior to an antibody response, so patients presenting clinical evidence of disease due to rickettsial infections, should be empirically treated with appropriate antibiotics, regardless of the outcome of initial laboratory testing [11]. Doxycycline is the treatment of choice for adults and children. Resistance to doxycycline has not yet been reported. Chloramphenicol may be used in cases of life-threatening allergy to doxycycline [17]. Rickettsial organisms are naturally resistant to many antimicrobial drugs routinely used as treatment for acute fevers, including  $\beta$ -lactams. Fluoroquinolones and newer macrolides are useful options of treatment [12]. Several species of SFR have been confirmed as human pathogens and the number is rising. Some examples are: *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. conorii*, *R. africae*, *R. felis*, *R. japonica*, *R. helvetica*, *R. montanensis*, *R. rhipicephalis* and *R. sibirica*.

Similar SFG, epidemic typhus, caused by *Rickettsia prowazekii*, is also usually associated with more severe symptoms, which typically begin suddenly, and high mortality in the absence of specific treatment. Regarding to endemic typhus, caused by *Rickettsia typhi* and occasionally *R. felis*, its clinical manifestations are also similar to those of SFG, but are less severe and rarely lead to death [6,18].

Diseases caused by agents of the *Rickettsia* genus can be diagnosed in a number of different ways; each approach has its advantages and its limitations. The specific laboratory confirmation could be either detection of specific DNA by PCR, demonstration of the organism in cell culture, or a fourfold rise in antibody titres on paired samples taken 2-4 weeks apart.

Rickettsiae are isolated most commonly from blood, skin biopsy specimens and autopsy tissue fragments or arthropods, especially ticks. Rickettsiae culture must be performed only in biosafety level 3 facilities, which are limited to Reference Centers or few research laboratories in the world [19,20].

Rickettsial antibodies can be detected by complement fixation, latex agglutination, enzyme-linked immunosorbent assay and immunofluorescence assay (IFA). IFA is the gold standard for serological diagnostic of rickettsial infections and it is performed worldwide [21]. Diagnostic criteria of recent infection by IFA test are either a 4-fold increase of immunoglobulin IgG or IgM titres in paired samples drawn  $\geq$  seven/10 days apart, or elevated IgG and/or IgM titres in single samples consistent with recent infection. A diagnostic IFA titre of  $< 64$  is not considered positive. A titre of  $> 64$  is considered exposure or probable acute infection without rising titre. Titres should be interpreted based on the background seroprevalence of endemic area [17]. The main limitation with serological diagnosis include a usually negative result in the acute phase when patients first seek medical care, poor sensitivity in cases treated with doxycycline, and an inability to distinguish among various rickettsial species caused by cross-reaction [12].

The greatest challenge to clinicians is not therapy but the difficult diagnosis during the early phase of infections [18]. The diagnosis of rickettsiosis can be missed because of these nonspecific initial clinical presentations and the absence of specific laboratory confirmation [22]. Serological diagnosis is usually retrospective; antibody increase takes 15-26 days, thus limiting the clinical impact of diagnosis [23].

Molecular diagnosis using polymerase chain reaction (PCR) targeting various rickettsial genes has been developed to accelerate the diagnosis of rickettsiosis and allow early species diagnosis. While some PCR target several species, others are designed to detect only a single rickettsial species. The five genes usually targeted by PCR for detection and diagnosis are citrate synthase *gltA*, gene D *sca4*, the 17kDa lipoprotein precursor antigen gene *17kDa*, and genes for outer membrane proteins A and B *ompA* and *ompB* [21,24]. Other targeted genes include 16S ribosomal RNA *16S rDNA*, serine peptidase *htrA* [20]. It should be noted that, in contrast to SFG rickettsiae, all rickettsiae belonging to TG (*R. prowazekii* and *R. typhi*) lack the *ompA* gene [25].

Rickettsial diagnosis based on PCR has been used extensively [20,24,26-31]. PCR primer sets, targeting various rickettsial genes, have been described and can be used in any laboratory with suitable facilities. Rickettsiae can be detected from clinical samples including skin biopsies, autopsy tissue fragments, blood and sera. Modifications of the PCR technique

led to its improvement and the development of the nested PCR (nPCR), which increased the sensitivity of PCR to the level of detecting 1-10 genomic equivalents per reaction [32].

Santibáñez and co-workers [20] evaluated the effectiveness of PCR methods to detect *Rickettsiae* from clinical samples. They determined the sensitivity and usefulness of molecular diagnosis targeting the *16S rDNA*, *htrA*, *gltA*, *ompA* and *ompB* genes by PCR. They performed single and sequential (nested or semi-nested) PCR assays. The samples tested were collected from patients in the early phase of the illness before antibiotic therapy. For single PCR assays, the greatest sensitivity to detect rickettsial DNA in clinical samples was obtained using *gltA* (33.3%). Higher sensitivity was achieved using sequential *ompB* PCRs (83.3%). They recommend performing *gltA* and *ompB* PCR assays, followed in positive samples by *ompA* PCR and nucleotide sequence analysis for species identification. The *ompB* PCR detects a high percentage of positive samples and it is effective as a first screening. The *ompA* PCR assay is an accurate method to diagnose and to implicate a new *Rickettsia* species. Combination of three sequential PCR assays (*ompA*, *ompB* and *gltA*) achieved 100% sensitivity [20]. Similarly, Sekeyova et al. [33] monitored clinical samples for *Rickettsia*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Coxiella*, *Anaplasma*, *Francisella* and *Diplorickettsia* from patients from Slovakia. They evaluated the seroprevalence by multiple-antigen IFA and confirmed the results with PCR. Serum samples from 50 hospitalized patients with suspected tick-borne diseases were evaluated. As a result, 32% were positive by IFA for spotted fever group rickettsia, but only 10% were confirmed by PCR. The discrepancy between IFA and PCR might be due to the sensitivity linked to the time of collection of the serum samples [33]. Therefore, these assays can provide high accuracy and sensitivity and have been used for the molecular diagnosis of rickettsioses, as well as to identify *Rickettsia* species in new clinical patients.

Newer molecular assays are also available. Pan et al. [18] evaluated the potential of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) targeting the *ompB* gene to detect SFG rickettsiae early infection. LAMP is a highly sensitive and specific technique that under isothermal conditions (60-65°C) can generate up to 10<sup>9</sup>-fold amplification in less than one hour. They compared the sensitivity of the *ompB* LAMP assay and general PCR. They found the limits of detection of LAMP and PCR for the *ompB* gene were 5 and 625 copies per reaction, respectively. Thus, the LAMP assay is 125-fold more sensitive than conventional PCR. They also evaluated the clinical applicability of the LAMP assay with clinical samples previously positive by serology or real-time PCR and compared the results of LAMP with nested PCR protocols. LAMP detected 8 of 10 confirmed cases while nested PCR detected none of the positive samples [18]. Thus, LAMP assay is a reliable test and could be an ideal choice for development as a rapid and cost-effective means of detecting SFG rickettsiosis.

Renvoisé et al. [34] evaluated the widespread use of real-time PCR for rickettsial diagnosis. They reported two years of their experience at the French National Reference Center (FNRC) with molecular diagnosis for rickettsial diseases using real-time PCR. They designed a new set of primers and probes to detect TG *Rickettsia*, and SFG *Rickettsia*, such as *R. conorii*, *R. slovaca*, *R. africae* and *R. australis*. Specificity was tested *in silico* using blastN analysis on GenBank and *in vitro* using a panel of 30 rickettsial strains. Sensitivity was determined by 10-fold serial dilution. Primers and probes both sensitive and specific were routinely used for diagnosis of rickettsial infections at FNRC. Among the positive clinical samples, 68.9% (31/45) were cutaneous biopsies, 17.8% (8/45) were cutaneous swabs, 4.4% (2/45) were total blood samples and 8.9% (4/45) were serum samples [34]. Based on these findings, it appears that real-time PCR could also be an option that can be

easily implemented in laboratories that have molecular facilities and its widespread use is inexpensive and reduces the delay of rickettsial diagnosis.

Angelakis et al. [35] performed a comparison between cell culture techniques and PCR for the diagnosis of *Rickettsia* infections. They analyzed skin biopsies and ticks collected from patients with suspected *Rickettsia* infections. They identified the presence of *Rickettsia* spp. in skin biopsies and ticks using molecular methods and cell culture. Culture methods were less sensitive than PCR. Culture sensitivity was low in patients under antibiotic treatment because of the high susceptibility of *Rickettsia* to antimicrobial agents. They found a positive correlation between the bacterial copies and the isolation success. Early antibiotic treatment, prior to skin biopsies, reduced the sensitivity of both methods tested [34]. As a result of these studies, it is suggested that PCR would be a much more promising as a reference laboratory technique than cell cultures that are less sensitive and much more demanding, and can also be affected by previous treatments.

A duplex real-time PCR, targeting the DNA of any rickettsial species and TG *Rickettsia* in clinical samples (skin biopsies) has also been developed [23]. The test was sensitive for at least 10 DNA copies per reaction and exhibited good reproducibility. The results from clinical samples allowed an early diagnosis of spotted fever in two cases and recognition of murine typhus in another. Despite the limited number of samples tested, the clinical experience with the duplex real-time PCR assay is encouraging. The recognition of typhus group rickettsia is clinically and epidemiologically relevant, as these infections may be associated with worse prognosis than spotted fever.

### **3. HUMAN GRANULOCYTIC ANAPLASMOSIS, HUMAN MONOCYTIC EHRLICHIOSIS AND THEIR DIAGNOSIS**

Intracellular bacteria of the Anaplasmataceae family cause ehrlichiosis and anaplasmosis. *Ehrlichia* and *Anaplasma* species are transmitted through the bite of an infected nymph, or adult tick vector that had been previously infected in larval or nymph stage while feeding on a rickettsial animal, known as a reservoir host. Their agents are maintained in nature through enzootic ticks as well as wild and domestic animals [11,36].

The causative agents of human monocytic ehrlichiosis (HME) and human granulocytic anaplasmosis (HGA) are small, Gram-negative, obligate intracellular bacteria that have tropism for specific leukocytes. HME has an affinity for monocytes and HGA preferentially infects granulocytes. They replicate within vacuoles in these leukocytes forming microcolonies called morulae, which allows the organisms to avoid phagocytosis to facilitate their survival [11,37,38].

Clinical presentations of ehrlichiosis and anaplasmosis are similar and nonspecific. HGA and HME are acute febrile tick-borne diseases. Fever is followed by headache, myalgia and arthralgia. Less common symptoms include nausea, abdominal pain, diarrhoea and cough. A rash may be present in 10-30% of cases of HME but is uncommon in HGA, present in less than 10% of infected patients. Neurologic symptoms, including meningitis and meningoencephalitis, have been reported in approximately 20% of patients with HME. Laboratory findings include leukopenia, thrombocytopenia, elevated serum aminotransferase levels, and elevated creatinine levels [37,38,39].

The diseases are considered as emerging and the number of reported cases has been growing due to better diagnostic techniques and surveillance programs [36]. Accurate

diagnosis of many tick-borne diseases is hampered owing to similar clinical manifestations, overlapping geographical distributions and shared vectors. Laboratory confirmation can be carried out using a number of microbiological, serological and molecular techniques [37].

Direct visualization of bacterial inclusions, termed morulae, in the cytoplasm of infected circulating leukocytes can allow rapid diagnosis of *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. [11,37,40]. Morulae detected in neutrophils are indicative of infection by *Anaplasma phagocytophilum*, while detection in monocytes delineates infection by *Ehrlichia chaffeensis* [37]. However, the low level of morulae, the short duration of rickettsemia, and the need of an experienced microscopist limit the utility of this approach.

Recovery of *E. chaffeensis* and *A. phagocytophilum* in mammalian cell culture can also be used to diagnose infection. *A. phagocytophilum* is usually cultivated in the human promyelocytic leukemia cell line HL-60 and the canine histocytic cell line DH28 is employed for culturing *E. chaffeensis* [37,41,42]. Limitations of cell culture as a diagnostic tool include the need of an antibiotic-free environment for growing these cell lines and technical staff trained in cell culture techniques. Besides, with this approach, it can take several days to obtain a positive result.

The indirect immunofluorescence assay (IFA) is the gold standard method proposed by the World Health Organization Collaborating Centre for Rickettsial Reference and Research. Antibodies in the serum bind to fixed antigens on a slide and are detected by a fluorescein-labelled conjugate. The greatest limitation of IFA is the need of a pair of serum samples from both acute and convalescent stages of the illness; which is not applicable as an early test for infection [18]. Nonspecificity can occur in IFA due to cross-reactivity. The Centers for Diseases Control and Prevention recommend that diagnoses based on serological tests should be confirmed by molecular methods [40].

A number of European countries have been confirmed as a hotspot for HGA and rickettsial diseases. Thus, Cochez and co-workers [43] presented results from a 10 years (2000-2009) study of *A. phagocytophilum* sero-surveillance in Belgium. Serum samples from 1350 patients were tested using an IFA IgG and IgM antibody test kit, according to the manufacturer's specifications (Focus Diagnostic, CA, USA). In total, 111 confirmed cases were detected. All cases had a history of tick bite, fever, and initially showed a titre of at least 64, which increased to 256 or higher in their follow-up sample. Based on these findings, the authors suggest that Belgium is a hot spot for HGA infections [43].

A number of clinical samples were also evaluated in France and positive results were identified both with spp. and *Ehrlichia* spp. during acute infection. Several conserved genes have been employed as PCR targets, including the *rrs* (16S rRNA) and *groESL* (heat shock operon). Koebel and co-workers [44] highlight the PCR assay on EDTA-blood samples as the diagnostic test of choice during acute phase of diseases. A Taqman-based real-time PCR was applied to amplify a 73-bp fragment from the *A. phagocytophilum msp2/p44* gene. They report confirmation of three consecutive clinical cases with HGA by Real-time PCR in eastern France [44]. Similarly, Edouard et al. [45] also reported five new human cases of *A. phagocytophilum* infection diagnosed by serology and Real-Time PCR. Serum specimens were tested with microimmunofluorescence assays using a large panel of antigens, including *A. phagocytophilum*. Serum samples were also screened with primers and probes targeting 102-bp of DNA polymerase I of *A. phagocytophilum*. A positive result was confirmed using primers and probes targeting a 92-bp fragment of the glutamyl tRNA amidotransferase gene.

Clinical samples were obtained retrospectively (2000-2010) from the archives of the National Reference Centre for Rickettsioses, Marseille, France [45].

Weil et al. [46] described a tick-associated pathogen panel (TAPP) that includes a PCR assay for the detection of the organisms that cause HGA, other human ehrlichioses (*A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii*), as well as *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti*, the causative agents of Lyme disease and babesiosis, respectively. The PCR targeted *HSPD1*, an open reading frame gene segment of the heat shock protein operon (*groESL*). From 692 samples tested, 33 presented an HGA-positive result. Serological assays were not included in this study [46]. The results of the authors would also suggest the potential of PCR for bacterial detection in the evaluation of more than one organism, even though they have not presented serological evidence for comparison.

Other currently proposed molecular detection methods include LAMP to detect *A. phagocytophilum* in clinical samples [47]. They developed a LAMP assay based on a conserved region in the *msp2* gene. The limits of detection of LAMP compared to PCR were 25 copies of *msp2* gene and 625 copies, respectively. Forty-two clinical samples were tested by LAMP and results were compared with nested-PCR and Real-time PCR. Twenty-six tested positive by LAMP assay while only one and three samples tested positive by nested-PCR and Real-time PCR, respectively. Thus, as shown earlier for rickettsias, LAMP is a rapid, simple, sensitive, and cost-effective assay for detecting *A. phagocytophilum* in clinical samples.

#### 4. BARTONELLA AND ITS DIAGNOSIS

*Bartonella* species are small, fastidious, intracellular, Gram-negative rod-shaped bacteria belonging to  $\alpha$ -Proteobacteria subgroup 2, with a worldwide distribution, which cause an increasingly large number of infectious diseases in humans and animals [48]. In 1993, Brenner and colleagues proposed to unify *Bartonella* and *Rochalimaea* genera and renamed some species as *Bartonella quintana*, *B. henselae*, *B. vinsonii* and *B. elizabethae*. As a result of this unification, the transfer of these organisms from the *Rickettsiaceae* family to the *Bartonellaceae* family was required and, at present, more than 31 species and subspecies are recognized [49].

Several hematophagous insects have been implicated in *Bartonella* transmission, including sand flies [50], the human body louse [51], the cat flea [52] and, potentially, ticks [53,54]. *Bartonella* infections have been encountered in all species surveyed, which extend to members of different orders of mammalian, including carnivores, primates, ungulates, rodents, and bats. It is believed that the vector preference for certain hosts can influence the transmission of these organisms and that is responsible for the association of a given *Bartonella* sp. with a specific host, i.e., *B. henselae*, *B. clarridgeiae* and *B. koehlerae* with cats, *B. alsatica* with wild rabbits, *B. bacilliformis* and *B. quintana* with humans [55,56].

Bartonellae have been recognized as agents causing human disease, including *B. bacilliformis* (agent of Oroya fever and verruga peruana), *B. henselae* (agent of cat scratch disease CSD, bacillary angiomatosis, bacillary peliosis, endocarditis) and *B. quintana* (agent of trench fever, bacillary angiomatosis, bacteremia and endocarditis) and *B. elizabethae* (agent of endocarditis), among others [55]. The *Bartonella* spp. infection can cause great diversity of clinical manifestations in humans, including recurrent fever and fever of unknown origin, malaise, fatigue, insomnia, loss of memory, psychiatric disorders, lymphadenopathy,

splenomegaly, angiomatosis and bacillary peliosis, endocarditis, hepatitis, osteomyelitis, encephalitis, meningitis, and other neuroretinites [57,58].

The genus *Bartonella* has pathogenic characteristics, such as the ability to invade and lyse red blood cells. Besides erythrocytes, the endothelial cells represent another target of *Bartonella* in their mammalian hosts [56]. Current opinion is that these cells serve as a primary niche for bartonellae prior to them entering the bloodstream. After five days, these bacteria are released into the bloodstream and then are able to invade erythrocytes, where occurs their intracellular replication [59].

Antimicrobials have been used widely in the treatment of bartonellosis. A study using azithromycin in CSD showed a benefit in lymph node regression in 30 days, as compared with placebo [60]. In immunocompromised patients the antimicrobials indicated are erythromycin, clarithromycin, azithromycin, doxycycline, either co-administered or not with rifampicin, and the period of treatment ranges from 4-6 weeks [60,61]. In the acute febrile phase of Carrion's disease the preferred treatment has been chloramphenicol [62], but oral ciprofloxacin has been increasingly and successfully used [61].

Several laboratory methods must be used in bartonellosis diagnostic to avoid false negatives; there is no gold standard [63]. Diagnostic techniques for infections with *Bartonella* spp. include serology by immunofluorescence (IFA) to detect antibodies against the bacteria in the patient's serum, culture of the pathogen, histopathological examination of lymph nodes or tissue biopsy of skin, liver or other affected organs, and molecular biology techniques, especially PCR, to amplify *Bartonella* spp. genes from patient's tissue fragments or blood [64,65].

Serology is particularly important because it allows the rapid identification of *Bartonella* spp. [64,66]. But it is limited by cross-reactions between the different species of *Bartonella*, and also between genera such as *Coxiella* and *Chlamydia* [67,68]. Many studies have shown that serological differentiation between *B. henselae* and *B. quintana* through IFA is impossible, since cross-reactivity between these species is very high (95%). The heterogeneity among strains and genotypes of *Bartonella* spp., might result in differences between the parameters of laboratory analysis and subjectivity of the readings of the results of IFA, which could result in false positives [69,70]. Despite these limitations, IFA remains the gold standard for the diagnosis of infection [68,71].

ELISA method has been proposed as an alternative to IFA. Several ELISA protocols use sonically disrupted *B. henselae* (whole cell-proteins) or the putative outer membrane proteins (OMPs) as the antigens [72,73]. However, studies have demonstrated low sensitivity of ELISA-based serodiagnosis when compared with IFA. Thus, researchers have focused their efforts on the improvement of the antigen preparation for use in IgG ELISA. Tsuruoka et al. [73] found that sarcosine-soluble proteins of *B. henselae* are significantly more specific than whole-cell or sarcosine insoluble proteins as antigens for IgG ELISA, indicating an improvement in accuracy of diagnosis of Bartonella infection [73].

The diagnosis of *Bartonella* infection should be confirmed by culturing the organism from aseptically obtained patient samples, including blood, CSF, lymph nodes, or other tissue aspiration samples, ocular exudates, and from surgical biopsies [58]. The liquid culture of *Bartonella* spp. is necessary to increase the sensitivity of detection of bacteraemia through molecular methods and is one of the most used methods of diagnosis worldwide [74,75,76]. The isolation of most species of *Bartonella* in blood agar plates requires a long incubation

period (6-8 weeks) at 35°C in a water saturated atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The development of a new liquid culture medium called BAPGM (*Bartonella* Alpha-Proteobacteria Growth Medium) that allows the growth of at least seven *Bartonella* species enabled the improvement of this method as diagnosis. It is now widely used as a pre-enrichment stage and, combined with molecular methods, increased the success and sensitivity of culture for diagnosis in both animals and humans [74-77]. However, to date, there is no consensus regarding the best culture medium or best antigen to be used in the diagnosis of bartonellosis.

Likewise, a consensus has not been achieved on the best gene to be used for primer development and optimal conditions to be used in PCR. Species-specific PCR has been useful, especially when a particular diagnosis is already suspected. Thus, several studies describe regions of the 16S *rRNA* gene, the 16S-23S *rRNA* intergenic spacer region-encoding gene (ITS), citrate synthase gene (*gltA*), the riboflavin synthase (*ribC*), the 60-kDa heat shock protein gene (*groEL*), the N-terminal region of the cell division protein gene (*FtsZ*) or gene of the beta subunit of RNA polymerase (*rpoB*) as the most efficient and promising primer targets for detection of different species of *Bartonella* [48,74].

Besides the set of primers that determine the region to be amplified and therefore the sensitivity of the reaction, the type of PCR also influences the success of the diagnosis. The nested PCR can greatly increase the sensitivity of detection, as does the real-time PCR [76,78]. A semi-nested PCR has also been designed to amplify the gene of a 31-kDa major protein (*Pap31*) associated with the bacteriophage harboured in *B. henselae* [79]. The main advantages of this technique are that it is easy and reliable, culture independent and almost all bacteria can be detected in a single reaction [67]. A limitation of the system is the quality of DNA of some clinical materials, high host DNA concentrations that interferes with DNA amplification of the *Bartonella* target and potential DNA contamination [64].

An important study conducted by La Scola et al. [80] using sequences available in the GeneBank database, compared seven gene targets, specifically the 16S *rDNA*, *gltA*, *groEL*, *rpoB*, *ftsZ*, *ribC* and the internal transcribed spacer 16S-23S (ITS). This comparison demonstrated the relative discriminatory power of each gene examined, and only two genes – *gltA* and *rpoB* – were able to clearly differentiate all species and subspecies of *Bartonella* analysed [80].

Newer molecular approaches in microbiology are available for characterization and typing of *Bartonella* genotypes [81]. The most widely used are pulse field gel electrophoresis (PFGE) [82], multilocus sequence typing (MLST) [83,84], multispacer typing (MST) and multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) [81].

## 5. Q FEVER AND *COXIELLA BURNETII* DIAGNOSIS IN HUMANS

*Coxiella burnetii* is a small, obligate intracellular, gram-negative, pleomorphic bacterium of the order Legionellales and is the cause of Q fever. *Coxiella burnetii* is very stable in the environment in its sporoid form. In natural infections, *Coxiella* has a tropism for cells of the mononuclear phagocytic class, such as lung alveolar macrophages, Kupffer cells of the liver and, more rarely, pneumocytes, fibroblasts and endothelial cells [85].

*Coxiella burnetii* exists in two antigenic phases, called phase I and phase II. In nature, the *C. burnetii* phase I expressed antigen is observed in humans, infected animals and arthropods and it is the infectious form of the bacterium. The phase II variant is obtained after several



passages in embryonated eggs or cell cultures and is less virulent [86]. The abnormally high resistance against chemical and physical factors, due to endospore formation, is one of the most impressive attributes of *C. burnetii*. It enables this organism to persist in the environment for long periods of time and remain infectious. The surviving ability of the organism, its resistance to heat, desiccation and many disinfectants, justifies its high infectivity, a fact that makes this proteobacteria a possible weapon of bioterrorism and an agent classified as category B. Studies show that a single inhaled organism may produce clinical disease [87,88].

Cattle, sheep and goats are the primary reservoirs of *C. burnetii*. Infection is known in a wide variety of other animals, including other species of ruminant domestic animals as well as wild animals [2,89]. The reservoirs of *C. burnetii* include mammals, birds and arthropods, especially ticks [90]. *Coxiella burnetii* does not usually cause clinical symptoms in these animals, although abortion in goats and sheep may be related to infection by this microorganism that is excreted in the milk, urine and feces of infected animals. During the time of birth of the animals, *C. burnetii* is present in great quantity in the amniotic fluid and placenta. Transmission to humans usually occurs through inhalation of contaminated aerosols from urine, feces, milk, amniotic fluid, placenta, abortion products, wool, or less commonly by drinking raw milk from infected animals [89]. This broad spectrum of unique reservoirs and resistance of *C. burnetii* to environmental factors makes, as mentioned previously, tracing the source of infection very difficult [91].

Infection with *C. burnetii* may present clinical manifestations of acute or chronic Q fever, a disease with a wide spectrum of clinical manifestations, ranging from limited febrile illness, pneumonia, hepatitis and other forms of infections, such as endocarditis, and meningoencephalitis [92,93]. The acute Q fever in humans is asymptomatic in almost 60% of infected people. Among the 40% of symptomatic patients, the majority (38% of 40%) undergo a mild disease without requiring hospitalization. In symptomatic patients, the onset is usually abrupt, with high fever, fatigue, chills and headaches. The most frequent clinical manifestation of acute Q fever is probably a self-limiting febrile disease associated with intense headache. Atypical pneumonia is also a frequent clinical presentation and clinical symptoms can vary from asymptomatic pneumonia, diagnosed by chest radiography, and rarely severe pneumonia resulting in acute respiratory failure. Hepatitis is another common presentation of acute Q fever detected biochemically by increased levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase. Hepatomegaly may be clinically detectable, but jaundice is rare [2].

Q fever can be considered chronic with the persistence of clinical manifestations for more than 6 months after the beginning of the symptoms. It occurs in approximately 5% of patients infected with *C. burnetii* and may develop insidiously over months to years after the acute illness. Patients with cardiovascular abnormalities are at higher risk of developing chronic infection. Normally, the heart is the organ most commonly involved, followed by arteries, bones and liver. Endocarditis usually occurs in patients with previous valvular lesions, or those who are immunocompromised, months or years later, and primarily with the involvement of the aortic valve [86]. Granulomatous hepatitis with a more protracted course can also be observed in some patients and the diagnosis is only possible by liver biopsies. Renal involvement with glomerulonephritis has also been described in Q fever [91,94,95]. Thus, endocarditis, vascular infections, osteoarticular infections, chronic hepatitis, chronic lung infections, chronic fatigue syndrome, prematurity in pregnancy and abortion are some of the clinical presentations that result from chronic infection. Coxiemia event results in permanent production and hence very high levels of antibodies in the circulation.

The difference in clinical presentation of Q fever can be explained by: (i) the route of infection by *C. burnetii*, including aerosol, or gastrointestinal tract, (ii) the dose of inoculation of *C. burnetii*, (iii) the variant of infective *C. burnetii*, and (iv) host factors, including immune status of the infected patient [2].

In contrast to acute Q fever in human, animal infection with *C. burnetii* is in most cases so amazingly asymptomatic. This fact implies that the term coxiellosis is considered a more appropriate than animal Q fever. In animals during acute phase, *C. burnetii* can be found in the blood, lungs, spleen and liver, while during the chronic phase *C. burnetii* is presented as a persistent release of the organism in feces and urine [96].

The reservoirs of *C. burnetii* are numerous, including mammals, birds and biological vectors (ticks). Forty species of ticks or more are naturally infected with *C. burnetii*, but are not important in the maintenance of infections in domestic animals and in humans [2]. *Coxiella burnetii* multiplies in intestine cells of ticks and a large number of viable organisms are eliminated through feces. Contaminated leather and wool become vehicles to transmission to people either by direct contact or through the dry feces, inhaled as dust particles suspended in the air [96]. Although it appears that wild rodents are an important reservoir, the most commonly identified source of human infection is farm animals such as cattle, goats and sheep. Pets, including cats, dogs and rabbits can also be potential sources of urban outbreaks. It is suspected that cats are a major reservoir of *C. burnetii* in urban areas. In Canada, studies have shown that 6-20% of cats have anti-*C. burnetii* antibodies [86].

Infected animals eliminate *C. burnetii* through urine, feces and milk products. The occurrence of infection reactivation in female mammals during pregnancy can result in abortions in goats and, to a lesser extent, in sheep, and cause reproductive problems in cattle. *C. burnetii* is located in the uterus and mammary glands of infected animals. High concentrations of *C. burnetii* (up to  $10^9$  bacteria per g of tissue) have been found in placentas, as well as in the milk of infected animals, although this form is probably less effective in spreading Q fever [2,86,96].

Q fever is a major public health problem in many countries especially in France [97] but also in Spain [98] and the Netherlands, where more than 3,500 cases were reported in the last three years [99-103]. *Coxiella burnetii* is responsible for 5-8% of cases of infective endocarditis in the south of France and Q fever cases occur in 50 per 100,000 inhabitants in this area [2,66,90,104,105,106]. More recent data show that throughout the French territory, the annual incidence of acute Q fever and endocarditis is 2.5/100,000 and 0.1/100,000 persons, respectively [97].

Since the first publication on the emergence of Q fever in the Netherlands, thousands of cases have been reported [101,107-115] and the study of small ruminants demonstrated that the same genotype *C. burnetii* identified in these animals was responsible for the epidemic of Q fever in the Netherlands [101]. Yet another study, conducted by Klaassen et al. [116], identified five genotypes of *C. burnetii* in six patients and six animals from three different regions of the Netherlands [116]. Based on the Q fever epidemic occurred in the Netherlands, the application and importance of an efficient surveillance system, aimed at early identification, has been emphasized [101,113].

The first case of Q fever in Brazil was described in 1953, and, despite being a worldwide zoonosis, remains neglected. Q fever is not a notifiable disease, perhaps because of the lack of human and animal clinical histories. Incidence and epidemiology remains unknown

and the scarce information on the serological evidence in humans and animals is restricted to the states of Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro and São Paulo [117-123]. The first case of Q fever in Brazil, confirmed by molecular analysis, was reported in the rural area of Itaboraí, Rio de Janeiro State, in 2008, when the patient reported a contact with products of goats' abortion [124]. Further study confirmed the presence of the antigen in the milk of goats and the serum of two dogs that had been fed non-pasteurized milk from these goats, confirming the origin of the source of infection of the patient [125]. According to Rozental et al. [126], the occurrence of Q fever in urban areas confirms the need to include its diagnosis in clinical cases compatible with a history of contact with childbirth or abortion material of pets like dogs and cats [126].

As with all zoonotic diseases, the animal disease control will influence the level of disease observed in humans. Appropriate strategies of tick control and good hygiene practices can reduce environmental contamination. Fluid and foetal membranes infected, aborted foetuses and contaminated bedding materials should be incinerated or buried after disinfection. Furthermore, manure must be treated with lime or calcium cyanide 0.4% before being spread on the fields, which must be done in the absence of wind to prevent the spread of the microorganism over long distances. Treatment of animals with antibiotics may be performed to reduce the number of abortions and the releasing *C. burnetii* in offsprings. Although it can be expensive, infected animals should be removed from or placed in confinement herds separated at birth. Workers from the animal industry should be fully informed about the risk factors for contracting Q fever and laboratories should be provided with adequate safety devices and equipment [96].

In relation to animals, the antibiotic treatment using tetracycline during the last month of pregnancy can reduce the number of abortions and the number of released *C. burnetii* in offspring. The efficacy of this treatment has never been assessed accurately but has not been proven to prevent abortion or completely eliminate the release of *C. burnetii* in newborns [127]. Similarly, regular pasteurization at 72°C for 15 seconds or sterilization of milk from infected flocks is recommended, even though oral is not the major route of transmission of *C. burnetii* [128].

As it has become clear above, the main characteristic of Q fever is its clinical polymorphism, and thus diagnosis can only be made by systematic tests. Clinically, it is likely that factors such as the route of infection and the size of the inoculum determine, in humans, the expression of infection by *C. burnetii*. In fact, the airway is associated with pneumonia, and the gastrointestinal tract with hepatitis [96], while high inoculations are associated with myocarditis [2].

With respect to laboratory diagnosis, Q fever may be detected by serological or molecular methods as well as isolation and histopathology associated with immunohistochemistry techniques. In cases of acute Q fever, antibody levels of phase II are usually higher than those of phase I, often by several orders of magnitude, and usually are first detected during the second week of infection. In the chronic phase the situation is reversed and antibodies to phase I antigens of *C. burnetii* have higher titres, requiring long time to appear and thus indicate continued exposure to the bacteria. In this context, high levels of antibodies to phase I samples later on, in combination with constant or falling levels of phase II antibodies and other signs of inflammatory disease may suggest chronic Q fever. It is known that antibodies against antigens of phase I and II persist for months or years after initial infection [2,96]. Since the clinical diagnosis is difficult, in most cases the diagnosis of Q fever depends

on serological tests. A variety of serological techniques are available, but the indirect microimmunofluorescence test became the reference technique [96].

A real-time PCR assay for the detection of *C. burnetii* DNA in serum samples, targeting the IS1111 transposase sequences (also known as *htpAB*-associated repetitive element) [129], was used in the Netherlands and in Brazil to diagnose acute Q fever early in infection to avoid delay in treatment that can lead to increased hospital admission rates and prolonged morbidity. Researchers found the latest time point after onset of disease in which *C. burnetii* could be detected by PCR of serum samples was day 17 [126,130]. During the last years, several PCR-based diagnostic assays were developed to detect *C. burnetii* DNA in cell cultures and in clinical samples. These assays used conventional PCR, nested PCR or real-time PCR conditions with Light-Cycler, SYBR Green or TaqMan chemistry [96,131]. The Light-Cycler Nested PCR (LCN-PCR), a rapid nested PCR assay that uses serum as a specimen and the Light-Cycler as a thermal cycler, targeting a multicopy 20-copy *htpAB*-associated element sequence, has been adapted for the diagnosis of both acute and chronic Q fever [96,132]. The LCN-PCR assay may be helpful in establishing an early diagnosis of chronic Q fever [90, 96]. Due to its high sensitivity and specificity, the repetitive element IS1111 is the best target gene for the detection of *C. burnetii* in patients with active Q fever [132], although the complete sequences of the genome of *C. burnetii* have recently become available, allowing a large choice of DNA targets.

Recently developed techniques such as MLVA and SNP typing have shown promise and improved the discrimination capacity and utility of genotyping methods for molecular epidemiologic studies of this challenging pathogen [133].

Initial typing systems described were based on plasmid types. Restriction fragment length polymorphisms (RFLP) were analyzed with SDS-PAGE, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and sequence studies of single genome targets like *16s/23s*, *com1*, *mucZ*, and *icd*. They showed different levels of discriminatory power and epidemiological significance, but all suffered with problems of inter- and intra-laboratory reproducibility, hampering their widespread use [133]. Other techniques that are used for plasmid typing (four different plasmids QpH1, QpRS, QpDV, and QpDG are utilized) include Multispacer Sequence Typing (MST), a method based on the analysis of the intergenic regions of genomes, Single Nucleotide Polymorphism (SNPs), Infrequent Restriction Site-(IRS)-PCR, Microarray-Based Whole-Genome Comparisons/Typing and the IS1111-insertion sequence, coding for a transposase seen in up to 56 copies in *C. burnetii* genomes [133].

## 6. ALTERNATIVE AND NOVEL APPROACHES TO BACTERIAL DETECTION

### 6.1 Bacterial Imaging

One method that has been growing in the detection of bacterial infections is the use of imaging. This has been achieved by the use of various imaging techniques and includes nuclear medicine approaches, nuclear magnetic resonance (NMR), optical probes, fluorescent and near-infrared imaging. A number of probes have been developed for the imaging of inflammation, including labelled monoclonal and polyclonal antibodies, cytokines, liposomes, leucocytes, antimicrobial peptides and antimicrobial agents among others [134,135]. The advantage of using nuclear medicine approaches is the differentiation between bacterial and viral infections, or inflammation due to infection with microbial pathogens (bacteria, fungus etc.) and inflammation due to immune response where no

microbial invasion is present, as is the case for example in autoimmune disorders [135]. This is achieved through the radiolabelling of antibiotics or other antimicrobial agents and their subsequent use as imaging agents. The advantage of using labelled antimicrobial agents as the localising agent for infection is the selective toxicity of these agents for microbial rather than human targets and the ability to bind selectively to those, offering the potential to rapidly distinguish a particular type of infection and differentiate it from others, thus influencing clinical decisions and therapeutic approaches [135]. Various antibiotics of broad-spectrum activity have been labelled to date, all or most of them with the radionuclide technetium 99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ), a radionuclide widely used in nuclear medicine. These antibiotics include ciprofloxacin (also known as  $^{99m}\text{Tc}$ -Infecton), sparfloxacin, enrofloxacin and ceftizoxime. Other agents used in bacterial imaging that are not antibiotics include  $^{99m}\text{Tc}$ -ubiquicidin, a cationic synthetic peptide [136,137] and [ $^{125}\text{I}$ ] FIAU 1-(2'-deoxy-2'-fluoro-b-D-arabinofuranosyl)-5-[ $^{125}\text{I}$ ] iodouracil, a substrate for bacterial thymidine kinase present in most bacteria [138,139].

Magnetic resonance imaging (MRI) is another imaging technique that offers the ability to visualise in real time the bacterial infections *in vivo* and study the impact of antibiotics on the bacterial proliferation and viability. The majority of MRI applications are in the detection of bacterial-associated conditions, such as bacterial meningitis [140], bacterial pyomyositis [141] or bacterial abscesses [142]. However, labelling of MRI probes has led to the development of MRI imaging directly for bacteria. Thus, *Bifidobacterium longum* and *Clostridium novyi-NT* were labelled with super paramagnetic iron oxide nanoparticles and they were subsequently followed by MRI [143]. Similarly, *P. aeruginosa* was labelled with green fluorescent protein (GFP) and was followed *in vivo* with magnetization transfer contrast MRI with excellent results, as it was shown able to be used to track bacterial proliferation and potentially gene expression *in vivo* [144].

Optical imaging of bacterial infection has also been developed, but it is primarily focused on the use of generic reporters, such as light-emitting enzymes (luciferase) and fluorescent proteins such as GFP. However, more specific probes offer the advantage of specific bacterial recognition. As molecular probes, in similar approaches to those described in nuclear medicine techniques, antibodies, sugars, bacteria-binding peptides and antibiotics have been used with varying results. In addition, a synthetic zinc (II) dipicolylamine (Zn-DPA) coordination complex has been used as affinity group in bacterial imaging studies labelled with a carocyanine dye. The complex has been able to stain the periphery of both Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) and Gram-negative (*Escherichia coli*) bacteria, giving clear images of the infection site and with no obvious side effects to the host. This technique would be easy to use and could have applications in infections at sites within the tissue penetration limit of the NIR light, such as skin, throat, urinary tract etc. Furthermore, altering the probes could offer more specific bacterial imaging [145].

Bacterial imaging has already been used in the area of rickettsioses, and in particular in the diagnosis of bartonellosis and cat scratch disease (CSD). It is known that ocular manifestations occur in 5%-10% of patient with CSD and several imaging modalities can be used to assist in the diagnosis and management of ocular CSD. They include colour fundus photography that allows the clinician to monitor the fundus changes in this disease, fluorescein angiography that demonstrates leakage at the optic nerve in CSD neuroretinitis and optical coherence tomography to provide confirmation in early stages of neuroretinitis before the formation of a macula star [146].

## 6.2 Bacterial Identification using Spectroscopic and Spectrometric Techniques

Mass spectrometry has found a number of applications in the identification of bacteria. Some have been used coupled with molecular biology techniques for bacterial typing [147,148], whilst others have been used for the detection of pathogens. MALDI time of flight (TOF) mass spectrometry can offer a robust automated methodology for bacterial analysis, based on the detection of patterns of protein masses and potentially genotyping of single nucleotide polymorphisms for additional accuracy of identification [149].

Eshoo et al. [150] developed a multilocus PCR and electrospray ionization mass spectrometry (PCR/ESI-MS) method for the detection of bacterial tick-borne pathogens, including *Ehrlichia* and *Anaplasma*, in blood specimens. The role procedure of PCR/ESI-MS assay can be completed within six hours. The assay employs 16 primer pairs, including four broad-range primer pairs targeting the 16S and 23S genes of all bacteria. The other primers were selected based on their coverage groups of known tick-borne bacteria. Following PCR, the amplicons are analysed in an electrospray ionization mass spectrometer. Two hundred and thirteen clinical specimens from suspected ehrlichiosis patients were included in the study. This demonstrated the ability of PCR/ESI-MS to correctly diagnose the pathogen responsible for ehrlichiosis and identify it to species level [150].

Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy is another spectroscopic technique that has found extensive use in bacterial detection. It has been used for bacterial analysis since the 1980s, and a lot of different types of bacteria have been investigated by FTIR, including *Listeria*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *E. coli* and *Lactobacillus* [151]. The authors presented the differential discrimination of *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Escherichia coli* K12, *Escherichia coli* ATCC 29181, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella subterranean*, *Enterobacter sakazakii* and *Enterobacter aerogenes*. They have managed to accurately identify the microorganisms, even in complex backgrounds containing other bacterial populations, and differentiate bacteria even within the same genotype independently of growth phase [151].

Several groups have been specialising on the FTIR detection of pathogens and bacteria in particular. Such works were characterised by the detection and characterisation of particular molecular groups of the bacteria, such as lipopolysaccharides from *E. coli* strains [152], to the identification of bacteria such as *E. coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* [153]. Additionally, bacteria have been detected by FTIR in complex media, such as *E. coli* O157:H7 in fruit juices [154], ground beef [155] and *Salmonella enterica* serovars in chicken breast [156].

In addition to the ability to differentiate between different bacterial cells in complex environments, FTIR has provided the possibility to identify treated and un-treated, or live and dead cells of the same bacteria [157]. Bacterial typing and subtyping at the haplotype level has also been described for *Listeria monocytogenes* [158] and *E. coli* O157:H7 isolates [159]. Finally, FTIR detection has been used in sensor development [160,161], amongst a number of other detection techniques, some of which will be briefly mentioned below on the biosensor section for bacterial detection.

FTIR remains a promising methodology that could be of interest in the detection of rickettsiosis, but so far it has been limited to applications in food borne pathogens. However, wider exploitation of this methodology could also offer a rapid and accurate detection and

typing methodology. Detection limit mentioned is 4.8-5.8 log CFU/ml. (about 100,000-500,000 bacteria/ml), when upper acceptable limit for bacteria in milk is 200,000/ml. That would, for example be of potential interest in the detection of *Coxiella* in milk.

### 6.3 Microarrays

One interesting approach to bacterial detection, and rickettsial detection in particular, that may offer differential diagnostic and simultaneous analysis of various samples, could be with the use of microarrays. A number of microarrays have been developed so far, based on the printing of a recognition element on a slide and subsequent detection of a signal. The recognition element can be protein, antibodies, carbohydrates or nucleic acids and different types of arrays have been resulted from the use of the above elements, with different scales of success. Thus, carbohydrate arrays have been described [162], where five different aminofunctionalised monosaccharide derivatives have been printed onto glass slides and the specific binding of fluorescently labelled *E.coli* ORN178 to mannose was observed. Furthermore, the array was shown to be able to differentiate between different strains of *E. coli* with differential affinity to mannose, and a detection limit of  $10^5$ - $10^6$  cells. On a similar approach, Wang et al. [163] have developed a carbohydrate microarray with 48 microbial polysaccharides for the specific recognition of carbohydrate-binding antibodies in the serum of patients. They were able to identify the particular type of infection based on the detection of patient antibodies with unique affinity for a specific pathogen polysaccharide, and with this methodology they successfully identified infections from *E. coli* and *Pneumococcus* and can be extended to a number of other pathogenic bacteria [163].

A similar, but somewhat reverse approach is the use of microarrays with lectins, to capture specific carbohydrate chains on the surface of bacterial cells. Most pathogenic bacteria possess cell surface polysaccharide or lipopolysaccharide shells, with crucial functions for their protection from the immune system and host invasion. Exploiting the natural affinity of lectins for bacterially expressed polysaccharides, lectin microarrays have been produced and utilised for bacterial detection. Lectins have been printed on glass slides and incubation with fluorescently labelled bacteria offered profiling of the diverse glycan structures [164,165,166] according to the specific binding of lectin to the lipopolysaccharide. As bacteria can specifically and reproducibly bind to certain lectins, such arrays can offer the potential to specifically differentiate bacterial species, or strains of the same bacterium with differential affinities to the specific lectin [164,167].

Protein microarrays have also been reported and, using antibodies as recognition agents, microarrays were able to detect *E. coli* and *Renibacterium Salmoninarum* [168]. One of the important characteristics of this work was the signal detection by scanning probe microscopy (SPM), whose high resolution imaging demonstrated the high binding selectivity of the antibodies for the specific bacteria, compared to signal from non-specific, control ones [168]. However, the most widely applied microarrays remain DNA microarrays. This has been primarily due to the technological developments that allow synthesis of oligonucleotides on the surface of the array directly and high-density printing. A number of commercial arrays are currently available, such as those available from Agilent, which allow up to a million oligonucleotide probes printed on a single slide. Other commercially available arrays include those from Affymetrix, NimbleGen, CombiMatrix, Oxford Gene Technologies, etc. Bacterial detection based on oligonucleotide arrays has been an active field of research and development for more than one decade, with reports of bacterial detection of a conserved bacterial gene in 2001 [169], species identification [170] and genotyping of bacterial pathogens using epidemiological markers [171-173].

Oligonucleotide arrays have been used in bacterial detection in a number of formats and for a number of applications. In rickettsial diseases, there has been use of microarrays in two different forms. First of all, based on the whole genome sequence of *R. prowazekii*, the Rickettsial Diseases Division of the U.S. Naval Medical Research Center constructed the first rickettsial microarray with all predicted ORFs. The genomic compositions of virulent strain and attenuated strain were studied by co-hybridization on this DNA microarray [174]. They have also deposited a patent for the detection and diagnosis of *R. prowazekii* infection, but this time by measuring the increased or decreased expression of specific human genes following infection, using DNA microarrays and PCR. This method permits the detection of the rickettsial infection and diagnosis of epidemic typhus earlier than other available methods [175]. Another DNA array for *R. prowazekii* has also been generated, which was the first DNA microarray for the analysis of global gene expression changes in *R. prowazekii* under stress conditions [176]. In addition to *R. prowazekii*, other *Rickettsia* microarrays are available based on rickettsial genomic information. The Rickettsia Genome microarray from Agilent Technologies, comprising probes specific to all genes and spacers from *R. prowazekii*, was used by Bechah et al (2010) for the genomic, proteomic and transcriptomic analysis of *R. prowazekii* [177]. The genome of *R. rickettsii* str. 'Sheila Smith' has also been provided and used for the development of a database containing 3205 oligonucleotides that represent the *R. rickettsii* 'Sheila Smith' transcriptome [178]. Within the same database for pre-designed oligonucleotide microarray probes, available to the research community, are included the sequences for specific strains of *R. rickettsii*, *R. africae*, *R. akari*, *R. bellii*, *R. canadensis*, *R. conorii*, *R. felis*, *R. massiliae*, *R. peacockii*, *R. prowazekii*, and *R. typhi* [178].

Finally, even this very year there has been a further development in bacterial detection by microarrays by Ballarini et al. [179] with the creation of the BactoChip microarray. Whereas the majority of microarrays use the 16S rRNA gene for diagnosis, the BactoChip uses 60-mer probes against an *in silico* identified set of genes. In so doing, BactoChip has been able to distinguish successfully among bacterial species from 21 different genera and determine the species-level relative abundances of 37 clinically relevant bacteria in complex bacterial communities and with a low detection limit of 0.1% [179]. Although "rickettsias *sensu lato*" are not included in this microarray, it is only a matter of time until an array containing rickettsias, either alone or amongst other bacteria with similar clinical manifestations, is created.

Apart from changing the probes on the microarrays and using a variety of molecules that have affinity for different bacterial parts, or using oligonucleotide probes against bacterial genes, there is significant development on signal detection and enhancement. The majority of microarrays are based on fluorescent detection. However, we already saw above the use of SPM for improved signal detection [168]. Other such techniques for improved detection include Resonance-Light Scattering (RLS), Planar-Waveguide Technology (PWT) [180], Infrared detection [181,182] and electrical or electrochemical detection [183].

#### 6.4 Biosensors

Biosensor technology holds great promise for the health care market, environmental diagnostics, the food industry and the veterinary sector; harnessing the specificity and sensitivity of biological-based assays packaged into portable and low cost devices which allow the rapid analysis of complex samples in out-of-laboratory environments. Numerous biosensors have been described for bacterial identification, based on a number of detection technologies and recognition elements. Thus, bacterial sensors have been characterised based on their transducer properties, which include surface plasmon resonance (SPR),



amperometric, potentiometric, and acoustic wave sensors [184]. These sensors have been independently reviewed in Zourob, Elwary and Turner (2008) [185] in individual chapters, including SPR [186], Evanescent Wave-based Fluorescent biosensors [187], Fiber Optic biosensors [188], Integrated Deep-Probe Optical Waveguides [189], Interferometric biosensors [190], Luminescence sensors [191], Porous and planar silicon sensors [192], Acoustic wave biosensors [193], Amperometric biosensors [194], Field Effect Transistors [195], Impedance-based sensors [196], Molecular Nanowire transducer-based sensors [197], Magnetic sensors [198], Cantilever sensors [199], Raman spectroscopy [200], and others.

The main biological sensing materials used in biosensor development are the couple antibody/antigen [201]. Yet, a number of other recognition elements are currently used, which include nucleic acid diagnostics [202], aptamers [203], molecularly imprinted polymers [204], phage display methods [205], bacteriophages [206,207]. An excellent representation of bacterial sensors and a review of progress of bacteriophage use in bacterial sensors are presented by Singh et al. [208], where the majority of types of sensors, including that of nucleic acids and antibodies are presented, in addition to bacteriophages, and tables of sensors available for specific microorganisms. Part of nucleic acid based sensors utilise a number of the techniques available in common molecular detection assays, such as PCR or real-time PCR amplification and subsequent detection of amplification products, but in a lab-on-chip format with integrated microfluidic platform systems and various transducer/detection methodologies, reviewed by Lui et al. [209].

There have not, as yet, appeared specific sensors for rickettsial diseases in the literature. However, a number of the currently available sensor methodologies would apply to the detection of rickettsias as well as the organisms they were originally designed for, or have used as exemplars. To that effect, a number of patents on sensor development for bacterial detection have already included rickettsias in their list of pathogenic organisms potentially detected by the patented sensor technology. Two such examples are the design of electrochemical sensors including electrode systems with increased oxygen generation [210,211], where the invention describes the development of systems and methods for electrochemical analyte detection based on increased oxygen generation. Though the initial idea is to measure glucose, the patent proposes to cover a number of other 'contemplated analytes', one of which is rickettsia. In a similar case, a transcutaneous analyte sensor is described by Brister et al. [212], for measuring analytes in a host. In that invention, it is specified that the analyte is used in a broad sense, to include, without limitation, reaction products, naturally occurring substances, artificial substances, metabolites and/or reaction products and it subsequently specifies an extensive, but not limiting list of chemicals, products and microorganisms that the sensor could be applied for, including rickettsia, and thus protecting the use of such sensors in rickettsial diseases.

There are, however, two specific references to rickettsial pathogen detection. One is on a document from the US Office of Scientific and Technical Information (OSTI) of the Department of Energy (DOE), where Andy Hatch describes the development of the first ultrasensitive microanalytical diagnostic method for rickettsial pathogens [213]. In the published summary of his report, he states the use of *in situ* polymerised porous polymer monoliths as size exclusion elements for capture and processing of rickettsial infected cells from a sample and as a photopatternable framework for grafting high densities of functionalised antibodies and fluorescent particles. With this, they have achieved selective capture and identification of bacterial cells with at least an order of magnitude improvement in the detection limits of currently available methodologies and reduced detection times

[213]. The second direct reference to the development of rickettsial sensors is again from the US, with the award of a programme for the development of 'Handheld Aptamer-Magnetic Bead-Quantum Dot Sensor for Rickettsiae' from the US Department of Defence (Small Business Innovation Research SBIR website) [214]. In this programme, they have proposed to use a previously developed sensor format for *Campylobacter jejuni* developed by Operational Technologies, that uses a rapid and ultrasensitive one-step plastic adherent DNA aptamer-magnetic bead plus aptamer-quantum dot sandwich assay to detect the bacteria in a handheld battery operated fluorimeter sensor that can be operated under field conditions. The group has now proposed to develop aptamers against a mixture of isolated rickettsias and substitute those used for the *Campylobacter* detection on the same sensor. No further data have been found to date regarding the outcome of this project.

The existence of these two efforts clearly demonstrates the applicability of sensor development for rickettsial diseases and it may prove to be a practical route to an economically viable and rapid diagnostic approach that would offer definitive response without the need for extensive laboratorial work and long waiting times for patient immune response, at least as a first approach, prior to confirmation by molecular techniques.

### 6.5 Aptamers

Aptamers offer an interesting and promising new approach for the detection of bacteria and the development of new assays that could offer a more rapid and accurate detection. They are, in effect, recognition elements that can be selected against any target of interest, bacterial proteins, DNA or entire bacterial cells, and be integrated into any of the potential new methodologies described above. Thus, aptamers have been used in molecular imaging techniques, labelled with radionuclides [215,216] for the diagnostic imaging of disease. Similarly, aptamers have been used in a number of microarray formats and in conjunction with various detection methodologies. For example, RNA aptamers have been used in conjunction with enzymatically amplified surface plasmon resonance imaging for the detection of protein biomarkers [217]. Similarly, aptamers have been used in microarrays for the capture of biomarkers in serum to be analysed and identified by Mass Spectrometry [218]. Aptamers have also been described in biosensor applications, as seen earlier on [203, 219]. In addition to their use in such more novel approaches to detection, they have directly substituted antibodies in more traditional approaches, such as ELISA, and have been used in conjunction with antibodies in sandwich ELISAs [220] and in the bacterial detection of *Francisella tularensis* in what is described as an aptamer-linked immobilized sorbent assay - ALISA [221].

Aptamers have been utilised extensively in the development of sensors for bacterial detection and there is an extensive list of bacteria that have been used as targets of aptamers and aptamer sensor development for detection and bacterial typing. Some examples include *Salmonella* species [222-224], *E. coli* [224,225], *Staphylococcus aureus* [224,226], *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis* [227], *Pseudomonas aeruginosa* [228], *Listeria monocytogenes* [229], *Francisella tularensis* [221], among others.

Despite the number of bacterial targets, both those used in diagnostic sensor development, as those mentioned above, and others used in the development of riboswitches, there have not been as yet any aptamers reported against rickettsias. However, *B. henselae* has been used as negative control, to show that aptamers were specific for *F. tularensis* but they did not bind to the related *Bartonella* [221] and, finally, they have appeared as the target in the development of the first rickettsial sensor by Jonh Bruno [214]. And as aptamers can be

applied in a variety of formats and can substitute antibodies in the more established and well-accepted ELISA and immunofluorescence assays, as well as in the variety of sensor development and microarray approaches, they show a great promise for bacterial diagnosis and detection of rickettsial infections in particular.

## 7. CONCLUSION

It is a big challenge for clinicians to offer an accurate diagnosis of rickettsial diseases during the early phase of infection. The gold standard serodiagnostic, immunofluorescence assay, is usually retrospective. The sensitivity of this method range from 84 to 100%, but it is limited by cross-reactivity. Antibodies increase takes more than 10 days, thus limiting the clinical impact of diagnosis. The isolation of rickettsia organisms in cell culture also take several days. Besides this, laboratory facilities with biosecurity level 3 are required. Molecular methods, based on PCR, for the diagnosis of human rickettsiosis allow rapid detection at the acute phase of infection and identification of bacterial species, even in small amount of the agent. Multiplex or Real-Time PCR can combine the detection of two or more agents of tick-borne infection into a single diagnostic test. Blood, serum, autopsy tissue fragments and skin biopsies specimens can be used as clinical samples to detect the rickettsial infection in molecular methods. The sensitivity of molecular method assays is linked to time of collection of clinical samples, the rickettsiemia level and is limited by the use of antibiotic therapy.

Various new approaches to the traditional assays have offered improvements to serologic and molecular diagnostic methods, which prove to be more sensitive than previous conventional methods. Thus, a novel enrichment liquid culture medium promotes the growth of *Bartonella* species in a shorter period, increasing the bacterial detectable level for PCR detection. The test double amplification (nested PCR), when compared with culture and simple PCR, is a more sensitive and faster method to detect bacteremia in both humans and animals. The use of combined approaches is also often necessary to minimize the chance of negative false results. Emphasizing that there is no gold standard for the diagnosis of bartonellosis and the difficulty of detecting bacteremia caused by *Bartonella* spp. increases the need to use different and complementary methods to increase the sensitivity and accuracy of diagnosis.

Various novel methodologies have for a long time being developed by research laboratories on the area of biosensors, microarrays, imaging methods or spectroscopic techniques, but most of them have not yet made it to the market, or at least they have not been accepted as techniques used in reference laboratories worldwide. According to Jeanne Moldenhauer [230], industry has been reluctant to follow scientific and technological advancements in the development of rapid/alternative microbiological methods due to two major reasons. One was the concern that regulators would not recognise or accept these methods in place of traditional methods. The other was that companies would not be allowed to change test limits based upon the test method, i.e. they would use a superior method that was likely to detect more organisms and not be allowed to adjust the limits to accommodate for the sensitivity of the new method [230]. Yet, it is likely that these inhibitions will necessarily be overcome, due to the limitations to current methodologies. Thus, DNA and aptamer microarrays could offer simultaneous detection of multiple parasites with similar broad clinical manifestations, and thus avoid misdiagnosis and wrong treatment, often detrimental for the patient. Similarly, direct ELISA or ALISA (aptamer-based ELISA type assay), if available, could eliminate the time necessary in rickettsioses for the detection of patient antibodies, and the need for double measurements to confirm infection. Finally, biosensor and aptasensor technologies could offer the possibility of early detection with cheap and

approachable diagnostic assays at the clinic or the field, rather than the need for all material to be analysed only at national reference centres. Thus, aptamers and sensor technologies that are currently in development could play a pivotal role in the detection and early treatment of rickettsial disease, thus significantly reducing the death toll associated with these infections and contributing to public health improvement.

#### CONSENT

Not applicable.

#### ETHICAL APPROVAL

Not applicable.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Dr Sotiris Missailidis and Dr Daniella Tupy de Godoy would like to thank CNPq for financial support.

#### COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

#### REFERENCES

1. Brenner DJ, O'Connor SP, Winkler HH, Steigerwalt AG. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., *B. elizabethae* comb. nov., and to remove the Family *Bartonellaceae* from to order *Rickettsiales*. Int J Syst Evol Microbiol. 1993;43:711-15.
2. Maurin M, Raoult D. Q Fever. Clin Microbiol Rev. 1999;12(4):518-53.
3. Zavala-Velazquez JE, Yu XJ, Walker DH. Unrecognized spotted fever group rickettsiosis masquerading as dengue fever in Mexico. Am J Trop Med Hyg. 1996;55(2):157-59.
4. Rozental T, Ereemeeva ME, Paddock CD, Zaki SR, Dasch GA, Lemos ERS. Fatal case of Brazilian spotted fever confirmed by immunohistochemical staining and sequencing methods on fixed tissues. Ann N Y Acad Sci. 2006;1078:257-59.
5. Lamas C, Favacho A, Rozental T, Bóia MN, Kirsten AH, Guterres A, et al. Characterization of *Rickettsia rickettsii* in a case of fatal Brazilian spotted fever in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Braz J Infect Dis. 2008;12(2):149-51.
6. Parola P, Paddock CD, Raoult D. Tick-borne rickettsioses around the world: Emerging diseases challenging old concepts. Clin Microbiol Rev. 2005;18:719-56.
7. Vitorino L, Chelo IM, Bacellar F, Zé-Zé L. *Rickettsiae* phylogeny: a multigenic approach. Microbiology. 2007;153:160-68.
8. Walker DH, Ismail N. Emerging and re-emerging rickettsioses: endothelial cell infection and early disease events. Nat Rev Microbiol. 2008;6:375-86.
9. Valbuena G, Walker DH. Infection of the endothelium by members of the order *Rickettsiales*. Thromb Haemost. 2009;102:1071-79.

10. Kantsø B, Svendsen CB, Jørgensen CS, Krogfelt KA. Comparison of two commercially available ELISA antibody test kits for detection of human antibodies against *Coxiella burnetii*. Scand J Infect Dis. 2012;44:489-94.
11. Nicholson WL, Allen KE, McQuiston JH, Breitschwerdt EB, Little SE. The increasing recognition of rickettsial pathogen in dogs and people. Trends Parasitol. 2010;26:205-12.
12. Jensenius M, Davis X, Von Sonnenburg F, Schwartz E, Keystone JS, Leder K, et al. For the GeoSentinel Surveillance Network. Emerg Infect Dis. 2009;15:1791-98.
13. Renvoisé A, Raoult D. L'actualité des rickettsioses. Med Mal Infect. 2009;39:71-81.
14. Basra G, Berman MA, Blanton LS. Murine typhus: An important consideration for the nonspecific febrile illness. Case Rep Med. 2012;ID134601.
15. Gehrke FS, Angerami RN, Marrelli MT, Souza ER, Nascimento EMM, Colombo S, et al. Molecular characterization of Mediterranean spotted fever rickettsia isolated from a European traveller in the State of São Paulo, Brazil. J Travel Med. 2013;20:54-56.
16. Decker CF. When to suspect tick-borne illness. Dis Mon. 2012;58:330-34.
17. Lin L, Decker CF. Rocky mountain spotted fever. Dis Mon. 2012;58:361-69.
18. Pan L, Zhang L, Wang G, Liu Q. Rapid, simple and sensitive detection of the *ompB* gene of spotted fever group rickettsia by loop-mediated isothermal amplification. BMC Infect Dis. 2012;12:254-60.
19. Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, Birtles RJ, Bjørnsdorff A, Blanco JR, et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. Clin Microbiol Infect. 2004;10:1108-32.
20. Santibáñez S, Portillo A, Santibáñez P, Palomar AM, Oteo JA. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. 2012; <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2012.08.001>
21. Kantsø B, Svendsen CB, Jørgensen CS, Krogfelt KA. Evaluation of serological tests for the diagnosis in Denmark. J Microbiol Methods. 2009;76:285-88.
22. Gehrke FS, Angerami RN, Marrelli MT, de Souza ER, do Nascimento EM, Colombo S, et al. Molecular characterization of Mediterranean spotted fever rickettsia isolated from a European traveller in the state of São Paulo, Brazil. J Travel Med. 2013;20(1):54-6.
23. Giulieri S, Jatón K, Cometta A, Trellu LT, Greub G. Development of a duplex real-time PCR for the detection of *Rickettsia* spp. And typhus group rickettsia in clinical samples. FEMS Immunol Med Microbiol. 2012;64:92-7.
24. Prakash JAJ, Lal TS, Rosemol V, Verghese VP, Pulimood SA, Reller M, et al. Molecular detection and analysis of spotted fever group *Rickettsia* in patients with fever and rash at a tertiary care center in Tamil Nadu, India. Pathog Glob Health. 2012;106:40-45.
25. Wölfel R, Essbauer S, Dobler G. Diagnostics of tick-borne rickettsioses in Germany: A modern concept for neglected disease. Int J Med Microbiol. 2008;298:368-74.
26. Kuloglu F, Rolain JM, Akata F, Eroglu C, Celik AD, Parola P. Mediterranean spotted fever in the Trakya region of Turkey. Ticks Tick Borne Dis. 2012;3:297-303.
27. Torina A, Fernandez de Mera IG, Alongi A, Mangold AJ, Blanda V, Scarlata F, et al. *Rickettsia conorii* indian tick typhus strain and *R. slovaca* in humans, Sicily. Emerg Infect Dis. 2012;18:1008-10.
28. Favacho ARM, Rozental T, Calic SB, Scofield MAM, Lemos ERS. Fatal Brazilian spotless fever caused by *Rickettsia rickettsii* in a dark-skinned patient. Rev Soc Bras Med Trop. 2011;44:395-96.
29. Zhang L, Ni D, Feng Z. External quality assessment of the detection of rickettsioses in China. Asian Pac J Trop Med. 2010;851-54.

30. Nilsson K. Septicaemia with *Rickettsia helvetica* in a patient with acute febrile illness, rash and myasthenia. *J Infection*. 2009;58:79-82.
31. Zavala-Castro J, Zavala-Velázquez J, Walker D, Pérez-Osorio J, Peniche-Lara G. Severe infection with *Rickettsia felis* associated with hepatitis in Yucatan, Mexico. *Int J Med Microbiol*. 2009;299:529-33.
32. Richards AL. Worldwide detection and identification of new and old rickettsiae and rickettsial diseases. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;64:107-10.
33. Sekeyova Z, Subramanian G, Mediannikov O, Diaz MQ, Nyitray A, Blaskovicova H, et al. Evaluation of clinical specimens for *Rickettsia*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Coxiella*, *Anaplasma*, *Francisella* and *Diplorickettsia* positivity using serological and molecular biology methods. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;64:82-91.
34. Renvoisé A, Rolain JM, Socolovschi C, Raoult D. Widespread use of real-time PCR for rickettsial diagnosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;64(1):126-9.
35. Angelakis E, Richet H, Rolain J-M, La Scola B, Raoult D. Comparison of real-time quantitative PCR and culture for the diagnosis of emerging rickettsioses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6:e1540.
36. Doudier B, Olano J, Parola P, Brouqui P. Factors contributing to emergence of *Ehrlichia* and *Anaplasma* spp. as human pathogens. *Vet Parasitol*. 2010;167:149-54.
37. Thomas RJ, Stephen Dumler J, Carlyon JA. Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and *Ehrlichia ewingii* ehrlichiosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009;7:709-22.
38. St. Clair K, Decker CF. Ehrlichioses: Anaplasmosis and human ehrlichiosis. *Dis Mon*. 2012;58:346-54.
39. Dahlgren FS, Mandel EJ, Krebs JW, Massung RF, McQuiston JH. Increasing Incidence of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* in the United States, 2000–2007. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85:124-31.
40. Centers for Disease Control and Prevention. Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: Rocky Mountain spotted fever, ehrlichioses, and anaplasmosis — United States: a practical guide for physicians and other health-care and public health professionals. *MMWR*. 2006;55(No. RR-4):1-36.
41. Standaert SM, Yu T, Scott MA, Childs JE, Paddock CD, Nicholson WL, et al. Primary isolation of *Ehrlichia chaffeensis* from patients with febrile illnesses: clinical and molecular characteristics. *J Infect Dis*. 2000;181:1082-88.
42. Goodman JL, Nelson C, Vitale B, Madigan JE, Dumler JS, Kurtti TJ, et al. Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N Engl J Med*. 1996;334: 209-15.
43. Cochez C, Ducoffre G, Vandenvelde C, Luyasu V, Heyman P. Human anaplasmosis in Belgium: A 10-year seroepidemiological study. *Ticks Tick Borne Dis*. 2011;2:156-59.
44. Koebel C, Kern A, Edouard S, Hoang AT, Celestin N, Hansmann Y, et al. Human granulocytic anaplasmosis in eastern France: clinical presentation and laboratory diagnosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;72:214-18.
45. Edouard S, Koebel C, Goehring F, Socolovschi C, Jaulhac B, Raoult D, et al. Emergence of human granulocytic anaplasmosis in France. *Ticks Tick Borne Dis*. 2012;3:402-04.
46. Weil AA, Baron EL, Brown CM, Drapkin MS. Clinical findings and diagnosis in human granulocytic anaplasmosis: A case series from Massachusetts. *Mayo Clin Proc*. 2012;87:233-39.
47. Pan L, Zhang L, Wang G, Liu Q, Yu Y, Wang S, Yu H, He J. Rapid, simple and sensitive detection of *Anaplasma phagocytophilum* by loop-mediated isothermal amplification of the *msp2* gene. *J Clin Microbiol*. 2011;49:4117-20.

48. Anderson BE, Neuman MA. *Bartonella* spp. As emerging human pathogens. Clin Microbiol Rev. 1997;10:203-19.
49. Kaiser PO, Riess T, O'Rourke F, Linke D, Kempf VA. *Bartonella* spp: throwing light on uncommon human infectious. Int J Med Microbiol. 2011;302:7-15.
50. Caceres AG. Geographic distribution of *Lutzomyia verrucarum* (Townsend, 1913) (díptera, Psychodidae, Phlebotominae), vector of human bartonellosis in Peru. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1993;35(6):485-90.
51. Roux V and Raoult D. Body lice as tools for diagnosis and surveillance of re-emerging disease. J Clin Microbiol. 1999;37:596-99.
52. Higgins JA, Radulovic S, Jaworski DC, Azad AF, Acquisition of the Cat Scratch Disease Agent *Bartonella henselae* by Cat Fleas (*Siphonaptera: Pulicidae*). J Med Entomol. 1996;33: 490-495.
53. Sanogo YO, Zeaiter Z, Caruso G, Merola F, Shpynov S, Brouqui P, et al. *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks (*Acari: Ixodida*) removed from humans, Belluno province, Italy. Emerg Infect Dis. 2003;9:329-32.
54. Billeter SA, Levy MG, Chomel BB, Breitschwerdt EB. Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. Med Vet Entomol. 2008;22:1-15.
55. Breitschwerdt EB, Kordick DL. *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. Clin Microbiol Rev. 2000;13:428-38.
56. Birtles R. *Bartonellae* as elegante hemotropic parasites. Ann NY Acad Sci. 2005;1063:270-79.
57. Chomel BB, Boulois HJ, Maruyama S, Breitschwerdt EB. *Bartonella* spp. in pets and effect on human health. Emerg Infect Dis. 2006;12:389-94.
58. Breitschwerdt EB, Maggi RG, Chomel BB, Lappin MR. Bartonellosis: an emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings. J Vet Emerg Crit Care. 2010;20:8-30.
59. Harms A, Dehio C. Intruders below the radar: molecular pathogenesis of *Bartonella* spp. Clin Microbiol Rev. 2012;25:42-78.
60. Bass JW, Freitas BC, Freitas AD, Sisler CL, Chan DSF, Vincent JM, et al. Prospective randomized double blind placebo-controlled evaluation of azithromycin for treatment of cat-scratch disease. Pediatr Infect Dis. 1998;17:447-452.
61. Rolain JM, Brouqui P, Koehler JE, Maguiña C, Dolan MJ, Raoult D. Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:1921-23.
62. Maguiña C, Guerra H, Ventosilla P. Bartonellosis. Clin Dermatol. 2009;27:271-80.
63. Maggi RG, Mascarelli PE, Pultorak EL, Hegarty BC, Bradley JM, et al. *Bartonella* spp. bacteraemia in high-risk immunocompetent patients. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;71:430-37.
64. Houpikian P, Raoult D. Diagnostic methods current best practices and guidelines for identification of difficult-to-culture pathogens in infective endocarditis. Cardiol, 2003;21:207-17.
65. Lamas C, Curi A, Boia MN, Lemos ERS. Human bartonellosis: seroepidemiological and clinical features with an emphasis on data from Brazil – A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103:221-35.
66. Houpikian P, Raoult D. Blood culture-negative endocarditis in a reference center: etiologic diagnosis of 348 cases. Medicine (Baltimore). 2005;84:162-173.
67. Fournier PE, Raoult D. Nonculture laboratory methods for the diagnosis of infectious endocarditis. Curr Infect Dis Rep. 1999;1:136-41.

68. Maurin M, Rolain JM, Raoult D. Comparison of in-house and commercial slides for detection of immunoglobulin G and M by immunofluorescence against *Bartonella henselae* and *B. quintana*. Clin Diagn Lab Immunol. 2002;9:1004-09.
69. Sander A, Berner R, Ruess M. Serodiagnosis of cat-scratch disease: response to *Bartonella henselae* in children and a review of diagnostic methods. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2001;20:392-401.
70. Vermeulen MJ, Verbakel H, Notermans DW, Reimerink JH, Peeters MF. Evaluation of sensitivity, specificity and cross-reactivity in *Bartonella henselae* serology. J Med Microbiol. 2010;59:743-45.
71. La Scola B, Raoult D. Serological cross-reactions between *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae*, and *Coxiella burnetii*. J Clin Microbiol. 1996;34:2270-74.
72. Vermeulen MJ, Herremans M, Verbakel H, Bergmans AMC, Roord JJ, vanDijken P, et al. Serological testing for *Bartonella henselae* in the Netherlands: Clinical evaluation of immunofluorescence assay and ELISA. Clin Microbiol Infect. 2007;13:627-34.
73. Tsuruoka K, Tsuneoka H, Kawano M, Yanagihara M, Nojima J, Tanaka T, et al. Evaluation of IgG ELISA using N-lauroyl-sarcosine-soluble proteins of *Bartonella henselae* for highly specific serodiagnosis of cat scratch disease. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;74:230-35.
74. Maggi RG, Duncan AW, Breitschwerdt EB. Novel chemically modified liquid medium that will support the growth of seven *Bartonella* species. J Clin Microbiol. 2005;43:2651-55.
75. Duncan AW, Maggi RG, Breitschwerdt EB. A combined approach for the enhanced detection and isolation of *Bartonella* species in dogs blood samples: pre-enrichment liquid culture followed by PCR and subculture onto agar plates. J Microbiol Methods. 2007;69:273-81.
76. Diaz MH, Bai Y, Malania L, Winchell JM, Kosoy MY. Development of a novel genus-specific real-time PCR assay for detection and differentiation of *Bartonella* species and genotypes. J Clin Microbiol. 2012;50:1645-49.
77. Cadenas MB, Maggi RG, Diniz PP, Breitschwerdt KT, Sontakke S, Breitschwerdt EB. Identification of bacteria from clinical samples using *Bartonella* alpha-proteobacteria growth medium. J Microbiol Methods. 2007;71:147-55.
78. Guptill L. Bartonellosis. Vet Microbiol. 2010;140:347-59.
79. Bowers TJ, Sweger D, Jue D, et al. Isolation, sequencing and expression. Of the gene encoding a major protein from the bacteriophage associated with *Bartonella henselae*. Gene. 1998;206:49-52.
80. La Scola B, Zeaiter Z, Khamis A, Raoult D. Gene-sequence based criteria for species definition in bacteriology: the *Bartonella* paradigm. Trends Microbiol. 2003;11:318-21.
81. Kosoy M, Hayman DTS, Chan KS. *Bartonella* bacteria in nature: where does population variability end and a species start? Infect Genet Evol. 2012;12:894-904.
82. Chang C-C, Chomel B, Kasten RW, Tappero JW, Sanchez M, Koehler JE. Molecular epidemiology of *Bartonella henselae* infection in human immunodeficiency virus-infected patients and their cat contacts using pulsed-field gel electrophoresis and genotyping. J Infect Dis. 2002;186:1733-39.
83. Fan Z, Chaloner G, Darby A, Xiu-ping S, Dong-mei L, Birtles R, Qi-yong L. Optimization of *Bartonella henselae* multilocus sequence typing scheme using single nucleotide polymorphism analysis of Solid sequence data. Chin Med. 2012;125:2284-88.
84. Iredell J, Blanckenberg D, Arvand D, Grauling S, Feil EJ, Birtles RJ. Characterization of the natural population of *Bartonella henselae* by multilocus sequence typing. J Clin Microbiol. 2003;41:5071-79.



85. Voth DE, Heinzen RA. Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of *Coxiella burnetii*. Cell Microbiol. 2007;9(4):829-40.
86. Fournier PE, Marrie TJ, Raoult D. Minireview Diagnosis of Q fever. J Clin Microbiol. 1998;36:1823-34.
87. Raoult D, Marrie T. Q fever. Clin Infect Dis. 1995;20(3):489-95.
88. Raoult D, Levy PI, Dupont HT, Chicheportiche C, Tamalet C, Gastaut JA, Salducci J. Q fever and HIV infection. AIDS. 1993;7:81-86.
89. Center for Disease Control and Prevention (CDC). Q fever. Atlanta, USA [updated January 18, 2011; cited 2011]. Available from: <http://www.cdc.gov/qfever/index.html>
90. Fenollar F, Fournier PE, Raoult D. Molecular Detection of *Coxiella burnetii* in the sera of patients with Q fever endocarditis or vascular infection. J Clin Microbiol. 2004;42(11):4919-4924.
91. Raoult D, Parola P. Rickettsial diseases. 1<sup>st</sup> ed. Informa healthcare. 400 pp. 2007. eBook ISBN 9781420019971.
92. Cunha BA, Nausheen S, Busch L. Severe Q fever community-acquired pneumonia (CAP) mimicking Legionnaires' disease: Clinical significance of cold agglutinins, anti-smooth muscle antibodies and thrombocytosis. Heart Lung. 2009;38:354-62.
93. Tissot-Dupont H, Raoult D. Q fever. Infect Dis Clin North Am. 2008;22(3):505-14, ix.
94. Olson JG, Mcdade J. *Rickettsia and Coxiella*. In Murray PR. Manual of Clinical Microbiology. 6. ed. ASM PRESS, Washington. 1994;678-84.
95. Brouqui P, Marrie TJ, Raoult D. *Coxiella*. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. Manual of Clinical Microbiology, ASM PRESS, Washington, 2003;1030-36.
96. Angelakis E, Raoult D. Review Q fever. Vet Microbiol. 2010;140:297-309.
97. Frankel D, Richet H, Renvoisé A, Raoult D. Q fever in France, 1985-2009. Emerg Infect Dis. 2011;17(3):350-6.
98. Montes M, Cilla G, Vicente D, Ercibengoa M, Perez-Trallero E. Gipuzkoa, Basque Country, Spain (1984-2004), a Hyperendemic area of Q fever. Ann N Y Acad Sci. 2006;1078:129-132.
99. Van der Hoek W, Dijkstra F, Schimmer B, Schneeberger PM, Vellema P, Wijkman C, et al. Q fever in the Netherlands: an update on the epidemiology and control measures. Euro Surveill. 2010;15(12):pii19520. Available: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19520>
100. Hilbert A, Reith P, Brockmann SO, Tyczka J, Fischer SF, Piechotowski I, et al. Epidemiological enquiries in two Q fever outbreaks in a community of Baden-Württemberg during 2008 and 2009. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2011;124(7-8):295-302.
101. Roest HI, Tilburg JJ, van der Hoek W, Vellema P, van Zijderveld FG, Klaassen CH, Raoult D. The Q fever epidemic in The Netherlands: history, onset, response and reflection. Epidemiol Infect. 2011;139(1):1-12.
102. Sprong H, Tjisse-Klasen E, Langelaar M, De Bruin A, Fonville M, Gassner F, et al. Prevalence of *Coxiella burnetii* in Ticks After a Large Outbreak of Q Fever. Zoonoses Public Health; 2011. [Epub ahead of print] doi: 10.1111/j.1863-2378.2011.01421.x
103. Whelan J, Schimmer B, DE Bruin A, VAN Beest Holle MR, VAN DER Hoek W, Ter Schegget R. Visits on 'lamb-viewing days' at a sheep farm open to the public was a risk factor for Q fever in 2009. Epidemiol Infect. 2011;11:1-7.
104. Bélec L, Ekala M-T, Gilquin J. *Coxiella burnetii* infection among HIV-1-infected people living in Paris, France. AIDS. 1993;7(8):1136-7.
105. Stein A, Raoult D. Q fever endocarditis. Eur Heart J. 1995;16(Suppl B):19-23.
106. Lamas CC, Eykyn SJ. Blood culture negative endocarditis: analysis of 63 cases presenting over 25 years. Heart. 2003;89:258-62.

107. Karagiannis I, Morroy G, Rietveld A, Horrevorts AM, Hamans M, Francken P, Schimmer B. A Q fever outbreak in the Netherlands: a preliminary report. *Eurosurveillance*. 2007;12(32):pii=3247.
108. Cilla G, Montes M, Pérez-Trallero E. Q fever in the Netherlands – what matters is seriousness of disease rather than quantity. *Eurosurveillance*. 2008;13(37):pii=18975.
109. Schimmer B, Morroy G, Dijkstra F, Schneeberger PM, Weers-Pothoff G, Timen A, Wijkmans C, van der Hoek W. Large ongoing Q fever outbreak in the south of The Netherlands. *Eurosurveillance*. 2008;13(31):pii=18939.
110. Karagiannis I, Schimmer B, Van Lier A, Timen A, Schneeberger P, Van Rotterdam B, et al. Investigation of a Q fever outbreak in a rural area of The Netherlands. *Epidemiol Infect*. 2009;137(9):1283-94.
111. Delsing CE, Kullberg BJ, Bleeker-Rovers CP. Q fever in the Netherlands from 2007 to 2010. *Neth J Med*. 2010;68(12):382-87.
112. Enserink M. Questions Abound in Q-Fever Explosion in the Netherlands. *Science*. 2010;327(5963):266-67.
113. Van den Wijngaard CC, van Pelt W, Nagelkerke NJ, Kretzschmar M, Koopmans MP. Evaluation of syndromic surveillance in the Netherlands: its added value and recommendations for implementation. *Euro Surveill*. 2011;16(9):pii=19806. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19806>
114. Van der Hoek W, Meekelenkamp JC, Leenders AC, Wijers N, Notermans DW, Hukkelhoven CW. Antibodies against *Coxiella burnetii* and pregnancy outcome during the 2007-2008 Q fever outbreaks in The Netherlands. *BMC Infect Dis*. 2011;11:44.
115. Van der Hoek W, Versteeg B, Meekelenkamp JC, Renders NH, Leenders AC, Weers-Pothoff I, et al. Follow-up of 686 patients with acute Q fever and detection of chronic infection. *Clin Infect Dis*. 2011;52(12):1431-36.
116. Klaassen CHW, Nabuurs-Franssen MH, Tilburg JJHC, Hamans MAWM, Horrevorts AM. Multigenotype Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(4):613-14.
117. Brandão H, Ribeiro do Valle LA, Christovão DA. Investigação sobre a febre Q em São Paulo. 1. Estudo sorológico em operários de um frigorífico. *Arq Fac Hig Saúde Publ Univ São Paulo*. 1953;7:127-34.
118. Costa PS, Brigatte ME, Greco DB. Questing one Brazilian query: reporting 16 cases of Q fever from Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med trop S Paulo*. 2006;48(1):5-9.
119. Lamas CC, Rozental T, Bóia MN, Favacho AR, Kirsten AH, da Silva AP, de Lemos ER. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in human immunodeficiency virus-positive patients in Jacarepaguá, Rio de Janeiro, Brazil. *Clin Microbiol Infect*. 2009;Suppl 2:140-41.
120. Ribeiro do Valle LA, Bassoi ON, Castro RM, Ferreira JM 1955. Febre Q em São Paulo. Primeiro caso confirmado por estudos sorológicos. *Rev Paul Med*. 46(6):447-56.
121. Riemann HP, Brant PC, Franti CE, Reis R, Buchanan AM, Stormont C, Behymer DE. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Coxiella burnetii* among students and other personnel in veterinary colleges in California and Brazil. *Am J Epidemiol*. 1974;100(3):197-208.
122. Siciliano RF, Ribeiro HB, Furtado RHM, Castelli JB, Sampaio RO, Santos FCP, et al. Endocarditis due to *Coxiella burnetii* (Q fever): a rare or little diagnosed disease? Case report. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(4):409-12.
123. Travassos J, Ubatuba A, Silva NP, Mello MT. Febre Q no Rio de Janeiro. *Cienc e Cult*. 1954;6:199-200.
124. Lemos ER, Rozental T, Mares-Guia MA, Almeida DN, Moreira N, Silva RG, Barreira JD, Lamas CC, Favacho AR, Damasco PV. Q fever as a cause of fever of unknown

- origin and thrombocytosis: first molecular evidence of *Coxiella burnetii* in Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011;11(1):85-7.
125. Mares-Guia MAMM. 2011. Febre Q no Município de Itaboraí, Rio de Janeiro: um estudo sorológico e molecular em amostras humanas, de animais vertebrados e de artrópodes em área de ocorrência de caso. Rio de Janeiro. Mestrado [Dissertação em Medicina Tropical] - Instituto Oswaldo Cruz.
  126. Rozental, T, Mascarenhas, LF, Rozenbaum, R, Gomes et al. *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever in Brazil: its hidden role in seronegative arthritis and the importance of molecular diagnosis based on the repetitive element IS1111 associated with the transposase gene. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107:695-97.
  127. Rodolakis A. Q Fever in Dairy Animals. *Rickettsiology and Rickettsial Diseases-Fifth International Conference: Ann NY Acad Sci.* 2009;1166:90-93.
  128. Arricau-Bouvery N, Rodolakis A. Is Q Fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet Res.* 2005;36:327-49.
  129. Hoover TA, Vodkin MH, Williams JC. A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. *J Bacteriol.* 1992;174(17):5540-48.
  130. Hendrix LR, Chen C. Antigenic Analysis for Vaccines and Diagnostics. In: Toman R; Heinzen RA; Samuel JE; Mege J-L. (Eds.) *Coxiella burnetii: Recent Advances and New Perspectives in Research of the Q Fever Bacterium Adv Exp Med Biol.* 2012;984:299-396.
  131. Klee SR, Ellerbrok H, Tyczka J, Franz T, Appel B. Evaluation of a real-time PCR assay to detect *Coxiella burnetii*. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1078:563-65.
  132. Fenollar F, Raoult D. Molecular diagnosis of bloodstream infections caused by non-cultivable bacteria. *Int J Antimicrob Agents.* 2007;30 Suppl 1:S7-15.
  133. Massung RF, Cutler SJ, Frangoulidis D. Molecular Typing of *Coxiella burnetii* (Q Fever). In: Toman, R.; Heinzen, R.A.; Samuel, J.E.; Mege, J.-L. (Eds.) *Coxiella burnetii: Recent Advances and New Perspectives in Research of the Q Fever Bacterium. Adv Exp Med Biol.* 2012;984:381-96.
  134. Gnanasegaran G, Croasdale J, Buscomebe JR. Nuclear medicine in imaging infection and inflammation: Part-I, radiopharmaceuticals. *World J Nucl Med.* 2004;3:155-65.
  135. Wareham D, Michael J and Das S. Advances in Bacterial Specific Imaging. *Braz Arch Biol Technol.* 2005;48:145-52.
  136. Welling MM, Lupetti A, Balter HS, Lanzzeri S, Souto B, Rey AM, Savio EO, Paulusma-Annema A, Pauwels EK, Nibbering PH. <sup>99m</sup>Tc-labeled antimicrobial peptides for detection of bacterial and *Candida albicans* infections. *J Nucl Med.* 2001;42:788-94.
  137. Assadi M, Vahdat K, Nabipour I, Sehat MR, Hadavand F, Javadi H, Tavakoli A, Saberifard J, Kalantarhormozi MR, Zakani A, Eftekhari M. Diagnostic value of <sup>99m</sup>Tc-ubiquicidin scintigraphy for osteomyelitis and comparisons with <sup>99m</sup>Tc-methylene diphosphonate scintigraphy and magnetic resonance imaging. *Nucl Med Commun.* 2011;32:716-23.
  138. Bettgowda C, Foss CA, Cheong I, Wang Y, Diaz L, Agrawal N, Fox J, Dick J, Dang LH, Zhou S, Kinzler KW, Vogelstein B, Pomper MG. Imaging bacterial infections with radiolabeled 1-(2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinofuranocyl)-5-iodouracil. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:1145-50.
  139. Pullambhatla M, Tessier J, Beck G, Jedynek B, Wurthner JU, Pomper MG. [<sup>125</sup>I]FAIU imaging in a preclinical model of lung infection: quantification of bacterial load. *Am J Nucl Med Mol Imaging.* 2012;2:260-70.
  140. Viu J, Monreal L, Jose-Cunilleras E, Cesarini C, Añor S, Armengou L. Clinical findings in 10 foals with bacterial meningoencephalitis. *Equine Vet J Suppl.* 2012;44(Suppl 41):100-4.

141. Yu CW, Hsiao JK, Hsu CY, Shih TT. Bacterial pyomyositis: MRI and clinical correlation. *Magn Reson Imaging*. 2004;22(9):1233-41.
142. Morais LT, Zanardi Vde A, Faria AV. Magnetic resonance spectroscopy in the diagnosis and etiological definition of brain bacterial abscesses. *Arq Neuropsiquiatr*. 2007;65:1144-48.
143. Wang J, Zhang X, Zhou D, Wang Q, Li D. Magnetic resonance imaging (MRI) in detection of *Bifidobacterium longum* and *Clostridium novyi-NT* labelled with superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticle. *Nature precedings*; 2009. Available at <http://precedings.nature.com/documents/3435/version/1> (accessed March 2013).
144. Righi V, Starkey M, Rahme LG, Tompkins RG, Tzika AA. Magnetization Transfer Contrast MRI detects *Pseudomonas aeruginosa* bacterial infection *bacterial infection* a mouse burn model. *Proc Intl Soc Mag Reson Med*. 2011;19:662.
145. Leevy WM, Gammon ST, Jiang H, Johnson JR, Maxwell DJ, Jackson EN, Marquez M, Piwnica-Worms D, Smith BD. Optical Imaging of Bacterial Infection in Living Mice Using a Fluorescent Near-Infrared Molecular Probe. *J Am Chem Soc*. 2006;128:16476-77.
146. McClintic J, Srivastava S. Imaging in the Diagnosis and management of ocular cat scratch disease. *Int Ophthalmol Clin*. 2012;4:155-61.
147. Sampath R, Hall TA, Massire C, Li F, Blyn LB, Eshoo MW, Hofstadler SA, Ecker DJ. Rapid Identification of Emerging Infectious Agents Using PCR and Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Ann NY Acad Sci*. 2007;1102:109–20.
148. Honisch C, Chen Y, Mortimer C, Arnold C, Schmidt O, van den Broom D, et al. Automated comparative sequence analysis by base-specific cleavage and mass spectrometry for nucleic acid-based microbial typing. *PNAS*. 2007;104:10649-54.
149. Sauer S, Freiwald A, Maier T, Kube M, Reinhardt R, Kostrzewa M, Geider K. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS ONE* 2008;3(7):e2843.
150. Eshoo MW, Crowder CD, Li H, Matthews HE, Meng S, Sefers SE et al. Detection and Identification of *Ehrlichia* Species in Blood by Use of PCR and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2010;48:472-78.
151. Puzey KA, Gardner PJ, Petrova VK, Donnelly CW, Petrucci GA. Automated species and strain identification of bacteria in complex matrices using FTIR spectroscopy. *Proc. SPIE* 6954, Chemical, Biological, Radiological, Nuclear, and Explosives (CBRNE) Sensing IX, 695412 (April 17, 2008)
152. Kim S, Burgula Y, Ojanen-Reuhs T, Cousin MA, Reuhs BL, Mauer LJ. Differentiation of Crude Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* Strains Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometrics, *J Food Sci*. 2006;71:M57-M61.
153. Burgula Y, Khali D, Kim S, Krishnan SS, Cousin MA, Gore JP, Reuhs BL, Mauer LJ. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium using filtration followed by Fourier transform infra red spectroscopy. *J Food Prot*. 2006;69:1777–84.
154. Burgula Y, Reuhs BL, Mauer LJ. Rapid FT-IR methods for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in fruit juices. *World food science* 2006, available at [http://www.worldfoodscience.org/pdf/FTIR\\_7.pdf](http://www.worldfoodscience.org/pdf/FTIR_7.pdf) (accessed March 2013).
155. Davis R, Irudayaraj J, Reuhs BL, Mauer LJ. Detection of *E.coli* O157:H7 from ground beef using Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy and Chemometrics. *J Food Sci*. 2010;75:M340-M346.
156. Davis R, Burgula Y, Deering A, Irudayaraj J, Reuhs BL, Mauer LJ. Detection and differentiation of live and heat-treated *Salmonella enterica* serovars inoculated onto chicken breast using Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *J Appl Microbiol*. 2010;109:2019-31.

157. Davis R, Deering A, Burgula Y, Mauer LJ, Reuhs BL. Differentiation of live, dead and treated cells of *Escherichia coli* O157:H7 using FT-IR spectroscopy. *J Appl Microbiol.* 2012;112:743-51.
158. Davis R, Mauer LJ. Subtyping of *Listeria monocytogenes* at the haplotype level by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and multivariate statistical analysis. *Int J Food Microbiol.* 2011;150:140-49.
159. Davis R, Paoli G, Mauer LJ. Evaluation of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and chemometrics as a rapid approach for subtyping *E. coli* O157:H7 isolates. *Food Microbiol.* 2012;31:181-90.
160. Ravindranath SP, Mauer LJ, DebRoy C, and Irudayaraj J. Bio-functionalized magnetic nanoparticle integrated mid-IR pathogen sensor for food matrices. *Anal Chem.* 2009;81(8):2840-46.
161. Mura S, Greppi G, Marongiu ML, Roggero PR, Ravindranath SP, Mauer LJ, et al. FTIR nanobiosensors for *Escherichia coli* detection. *Beilstein J Nanotechnol.* 2012;3:485-92.
162. Disney MD, Seeberger PH. The use of carbohydrate microarrays to study carbohydrate-cell interactions and to detect pathogens. *Chem Biol.* 2004;11:1701-07.
163. Wang DN, Liu SY, Trummer BJ, Deng C, Wang AL. Carbohydrate microarrays for the recognition of cross-reactive molecular markers of microbes and host cells. *Nat Biotechnol.* 2002;20:275-81.
164. Hsu KL, Pilobello KT, Mahal LK. Analyzing the dynamic bacterial glycome with a lectin microarray approach. *Nature Chem Biol.* 2006;2:153-57.
165. Mahal LK, Pilobello K, and Rishnamoorthy L. Development of a lectin microarray for the glycomic profiling of cells. *Glycobiology.* 2004;14:1203-06.
166. Zheng T, Peelen D, Smith LM. Lectin arrays for profiling cell surface carbohydrate expression. *J Am Chem Soc.* 2005;127:9982-83.
167. Liu H. Pathogenic bacterial sensors based on carbohydrates as sensing elements. In: Zourob M, Elwary S and Turner APF, editors. *Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and microsystems*, SpringerLink; 2008.
168. Howell SW, Inerowicz HD, Regnier FE, Reifemberger R. Patterned protein microarrays for bacterial detection. *Langmuir.* 2003;19:436-39.
169. Small J, Call DR, Brockman FJ, Straub TM, Chandler DP. Direct detection of 16S rRNA in soil extracts by using oligonucleotide microarrays. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67:4708-16.
170. Wilson KH, Wilson WJ, Radosevich JL, DeSantis TZ, Viswanathan VS, Kuczumski TA, Andersen GL. High-density microarray of small-subunit ribosomal DNA probes. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68:2535-41.
171. Yue H, Eastman PS, Wang BB, Minor J, Doctolero MH, Nuttall RL, Stack R, Becker JW, Montgomery JR, Vainer M, Johnston R. An evaluation of the performance of cDNA microarrays for detecting changes in global mRNA expression. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:E41.
172. Chizhikov V, Rasooly A, Chumakov K, Levy DD. Microarray analysis of microbial virulence factors. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67:3258-63.
173. Volokhov D, Rasooly A, Chumakov K, Chizhikov V. Identification of listeria species by microarray-based assay. *J Clin Microbiol.* 2002;40:4720-28.
174. Naval Medical Research Center. Rickettsial Diseases Division. Accessed 30 March 2013. Available: [http://www.med.navy.mil/sites/nmrc/Pages/id\\_rd.htm](http://www.med.navy.mil/sites/nmrc/Pages/id_rd.htm)
175. Ching WM, Ge H. Diagnostic assay for rickettsia prowazekii disease by detection of responsive gene expression. USPTO Application #20060099628; 2004.

176. Audia JP, Patton MC, Winkler HH. DNA microarray analysis of the heat shock transcriptome of the obligate intracytoplasmic pathogen *Rickettsia prowazekii*. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74:7809-12.
177. Bechah Y, Karkouri KE, Mediannikov O, Leroy Q, Pelletier N, Robert C, Medigue C, Mege JL, Raoult D. Genomic, proteomic and transcriptomic analysis of virulent and avirulent *Rickettsia prowazekii* reveals its adaptive mutation capabilities. *Genome Res*. 2010;20:655-63.
178. OligoArrayDb, Accessed 30 March 2013. Available: <http://berry.engin.umich.edu/oligoarraydb/>
179. Ballarini A, Segata N, Huttenhower C, Jousson O. Simultaneous quantification of multiple bacteria by the bactochip microarray designed to target species-specific marker genes. *PLoS ONE*. 2013;8(2):e55764.
180. Kostic T, Francois P, Bodrossy L, Schrenzel J. Oligonucleotide and DNA microarrays: versatile tools for rapid bacterial diagnostics. In: Zourob M, Elwary S and Turner APF, editors. *Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems*. SpringerLink; 2008.
181. Mossoba MM, Al-Khaldi SF, Kirkwood J, Fry FS, Sedman J, Ismail AA. Printing microarrays of bacteria for identification by infrared microspectroscopy. *Vib Spectrosc*. 2005;38:229-35.
182. Al-Khaldi SF, Mossoba MM, Allard MM, Lienau EK, Brown ED. Bacterial detection and subtyping using DNA microarray and DNA sequencing. *Methods Mol Biol*. 2012;881:73-95.
183. Elsholz B, Worl R, Blohm L, Albers J, Feucht H, Grunwald T, Jurgen B, Schweder T and Hintsche R. Automated detection and quantification of bacterial RNA by using electrical microarrays. *Anal Chem*. 2006;78:4794-802.
184. Leonard P, Hearty S, Brennan J, Dunne L, Quinn J, Chakraborty T, O'Kennedy R. Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. *Enzyme Microb Technol*. 2003;32:3-13.
185. Zourob M, Elwary S, Turner APF, editors. *Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and microsystems*, SpringerLink; 2008.
186. Taylor AD, Ladd J, Homola J, Jiang S. Surface plasmon resonance (SPR) sensors for the detection of bacterial pathogens. In: Zourob M, Elwary S and Turner APF, editors. *Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems*. SpringerLink; 2008.
187. Sapsford KE, Shriver-Lake LC. Bacterial detection using evanescent wave-based fluorescent biosensors. In: Zourob M, Elwary S and Turner APF, editors. *Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems*. SpringerLink; 2008.
188. Hayman RB. Fiber optic biosensors for bacterial detection. In: Zourob M, Elwary S and Turner APF, editors. *Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems*. SpringerLink; 2008.
189. Zourob M, Skivesen N, Horvath R, Mohr S, McDonnell MB. Integrated deep-probe optical waveguides for label free bacterial detection. In: Zourob M, Elwary S and Turner APF, editors. *Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems*. SpringerLink; 2008.
190. Campbell DP. Interferometric biosensors. In: Zourob M, Elwary S and Turner APF, editors. *Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and microsystems*. SpringerLink; 2008.

191. Farris L, Habteselassie MY, Perry L, Chen Y, Turco R. Luminescence techniques for the detection of bacterial pathogens. In: Zourob M, Elwary S and Turner APF, editors. Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems. SpringerLink; 2008.
192. Mace CR, Miller BL. Porous and Planar Silicon Sensors. In: Zourob M, Elwary S and Turner APF, editors. Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems. SpringerLink; 2008.
193. Olsen E, Vainrub A, Vodyanoy V. Acoustic wave (TSM) biosensors: weighing bacteria. In: Zourob M, Elwary S and Turner APF, editors. Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems. SpringerLink; 2008.
194. Palchetti I, Mascini M. Amperometric biosensor for pathogenic bacteria detection. In: Zourob M, Elwary S and Turner APF, editors. Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems. SpringerLink; 2008.
195. Miyahara Y, Sakata T, Matsumoto A. Microbial genetic analysis based on field effect transistors. In: Zourob M, Elwary S and Turner APF, editors. Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems. SpringerLink; 2008.
196. Munoz-Berbel X, Godino N, Laczka O, Baldrich E, Munoz FX. Impedance-based biosensors for pathogen detection. In: Zourob M, Elwary S and Turner APF, editors. Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems. SpringerLink; 2008.
197. Alocilja E, Muhammad-Tahir Z. Label-Free Microbial biosensors using molecular nanowire transducers. In: Zourob M, Elwary S and Turner APF, editors. Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems. SpringerLink; 2008.
198. Haik Y, Sawafta R, Ciubotaru I, Qablan A, Tan EL, Ong KG. Magnetic techniques for rapid detection of pathogens. In: Zourob M, Elwary S and Turner APF, editors. Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems. SpringerLink; 2008.
199. Mutharasan R. Cantilever sensors for pathogen detection. In: Zourob M, Elwary S and Turner APF, editors. Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems. SpringerLink; 2008.
200. Grow AE. Label-Free Fingerprinting of pathogens by raman spectroscopy techniques. In: Zourob M, Elwary S and Turner APF, editors. Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems. SpringerLink; 2008.
201. Banada PP, Bhunia AK. Antibodies and immunoassays for detection of bacterial pathogens. In: Zourob M, Elwary S and Turner APF, editors. Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems. SpringerLink; 2008..
202. Glynn B. Rapid nucleic acid-based diagnostics methods for the detection of bacterial pathogens. In: Zourob M, Elwary S and Turner APF, editors. Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems. SpringerLink; 2008.
203. Fowler CC, Navani NK, Brown ED, Li Y. Aptamers and their potential as recognition elements for the detection of bacteria. In: Zourob M, Elwary S and Turner APF, editors. Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems. SpringerLink; 2008.
204. Warriner K, Lai EPC, Namvar A, Hawkins DM, Reddy SM. Molecularly imprinted polymers for biorecognition of bioagents. In: Zourob M, Elwary S and Turner APF, editors. Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems. SpringerLink; 2008.

205. Gulig PA, Martin JL, Messer HG, Deffense BL. Phage display methods for detection of bacterial pathogens. In: Zourob M, Elwary S and Turner APF, editors. Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems. SpringerLink; 2008.
206. Schmelcher M, Loessner MJ. Bacteriophage: powerful tools for the detection of bacterial pathogens. In: Zourob M, Elwary S and Turner APF, editors. Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems. SpringerLink; 2008.
207. Smietana M, Bock WJ, Mikulic P, Ng A, Chinnappan R and Zourob M. Detection of bacteria using bacteriophages as recognition elements immobilized on long-period fiber gratings. *Opt Express*. 2011;19:7971-78.
208. Singh A, Poshtiban S, Evoy S. Recent advances in bacteriophage based biosensors for food-borne pathogen detection. *Sensors*. 2013;13:1763-86.
209. Lui C, Cady NC, Batt CA. Nucleic acid-based detection of bacterial pathogens using integrated microfluidic platform systems. *Sensors*. 2009;9:3713-44.
210. Simpson PC, Goode P, Tapsak MA, Carr-Brendel V. Electrochemical sensors including electrode systems with increased oxygen generation. Patent Number 7108778. Filing date 2004.
211. Simpson PC, Petisce JR, Carr-Brendel VE, Brauker JH. Electrode systems for electrochemical sensors. US20120228134 A1, Filing date May 2012.
212. Brister M, Neale PV, Brauker J. Transcutaneous analyte sensor. US 2010/0174164 A1, Filing date March 2010.
213. Hatch A. Ultrasensitive microanalytical diagnostic methods for rickettsial pathogens. Accessed 30 March 2013. Available: [http://www.osti.gov/bridge/product.biblio.jsp?osti\\_id=1035853](http://www.osti.gov/bridge/product.biblio.jsp?osti_id=1035853)
214. Bruno J. Handheld aptamer-magnetic bead-quantum dot sensor for rickettsias. Small Business Innovation Research SBIR website, Accessed 30 March 2013. Available: <http://www.sbir.gov/sbirsearch/detail/8253>
215. Borbas KE, Ferreira CSM, Perkins A, Bruce JI, Missailidis S. Design and synthesis of mono- and multimeric targeted radiopharmaceuticals based on novel cyclen ligands coupled to anti-MUC1 aptamers for the diagnostic imaging and targeted radiotherapy of cancer. *J Bioconj Chem*. 2007;18(4):1205-12.
216. DaPieve C, Perkins AC, Missailidis S. Anti-MUC1 aptamers: radiolabelling with <sup>99m</sup>Tc and biodistribution in MCF-7 tumour-bearing mice. *Nuclear Med Biol*. 2009;36:703-10.
217. Li Y, Lee HJ, Corn RM. Detection of protein biomarkers using RNA aptamer microarrays and enzymatically amplified surface plasmon resonance imaging. *Anal Chem*. 2007;79(3):1082-88.
218. Ahn JY, Lee SW, Kang HS, Jo M, Lee D, Laurell T, Kim S. Aptamer microarray mediated capture and mass spectrometry identification of biomarker in serum samples. *J Proteome Res*. 2010; 9:5568-73.
219. Velasco-Garcia MN, Missailidis S. New trends in aptamer-based electrochemical biosensors. *Gene Ther Mol Biol*. 2009;13:1-10.
220. Ferreira CSM, Papamichael K, Guilbault G, Schwarzacher T, Garipey J, Missailidis S. DNA aptamers against MUC1: design of aptamer-antibody sandwich ELISA for early tumour diagnosis. *Anal Bioanal Chem*. 2008;390(4):1039-50.
221. Vivekananda J, Kiel JL. Anti-*Francisella tularensis* DNA aptamers detect tularemia antigen from different subspecies by aptamer-linked immobilized sorbent assay. *Lab Invest*. 2006;86:610-18.
222. Labib M, Zamay AS, Kolovskaya OS, Reshetneva IT, Zamay GS, Kibbee RJ, Sattar SA, Zamay TN, Berezovski MV. Aptamer-based impedimetric sensor for bacterial typing. *Anal Chem*. 2012;84(19):8114-17.



223. Hyeon JY, Chon JW, Choi IS, Park C, Kim DE, Seo KH. Development of RNA aptamers for detection of *Salmonella enteritidis*. J Microbiol Methods. 2012;89(1):79-82.
224. Maeng JS, Kim N, Kim CT, Han SR, Lee YJ, Lee SW, Lee MH, Cho YJ. Rapid detection of food pathogens using RNA aptamers-immobilized slide. J Nanosci Nanotechnol. 2012;12(7):5138-42.
225. Li H, Ding X, Peng Z, Deng L, Wang D, Chen H, He Q. Aptamer selection for the detection of *Escherichia coli* K88. Can J Microbiol. 2011;57(6):453-59.
226. Duan N, Wu S, Zhu C, Ma X, Wang Z, Yu Y, Jiang Y. Dual-color upconversion fluorescence and aptamer-functionalized magnetic nanoparticles-based bioassay for the simultaneous detection of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. Anal Chim Acta. 2012;723:1-6.
227. Fan M, McBurnett SR, Andrews CJ, Allman AM, Bruno JG, Kiel JL. Aptamer selection express: a novel method for rapid single-step selection and sensing of aptamers. J Biomol Tech. 2008;19:311-19.
228. Wang KY, Zeng YL, Yang XY, Li WB, Lan XP. Utility of aptamer-fluorescence in situ hybridization for rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011;30(2):273-78.
229. Ohk SH, Koo OK, Sen T, Yamamoto CM, Bhunia AK. Antibody-aptamer functionalized fibre-optic biosensor for specific detection of *Listeria monocytogenes* from food. J Appl Microbiol. 2010;109(3):808-17.
230. Moldenhauer, J. Overview of rapid microbiological methods. In: Zourob M, Elwary S and Turner APF, editors. Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems. SpringerLink; 2008.

© 2014 Missailidis et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:

The peer review history for this paper can be accessed here:  
<http://www.sciencedomain.org/review-history.php?iid=321&id=19&aid=2572>

## Virus Reviews and Research

Sociedade Brasileira de Virologia

journal homepage: [www.sbv.org.br/vrr/](http://www.sbv.org.br/vrr/)

### Research Article

## APTAMERS IN THE DIAGNOSIS OF RICKETTSIOSIS SENSU LATO

Daniela Tupy de Godoy, Sotiris Missailidis\*, Alessandra RM Favacho, Maria Angélica MM Mares-Guia, Tatiana Rozental, Elba Regina Sampaio Lemos

Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

### ABSTRACT

Aptamers are short synthetic oligonucleotides that specifically bind to various molecular targets with high affinity and selectivity. Aptamers have found two main applications in bacteriology, diagnosis in various sensing applications and riboswitches. Rickettsiosis are diseases caused by rickettsias '*sensu lato*' including spotted fever, typhus, anaplasmosis, ehrlichiosis, bartonellosis and Q fever. Traditional methodologies for the diagnosis of diseases associated with rickettsias '*sensu lato*' are based on serological testing, bacterial cultures and molecular assays. However, an increasing number of novel technologies, including aptamer-based diagnostic sensors, are now on the horizon, opening up possibilities for earlier diagnosis and more sensitive assays. This perspective looks at the contribution of aptamers to rickettsias '*sensu lato*' diagnosis, providing information on the 'state of the art' in this emerging field..

**Keywords:** Biosafety, Rodent, Fieldwork  
II Simpósio Avançado de Virologia Hermann Schatzmayr

### INTRODUCTION

Significant advances in detection and clinical diagnosis of bacterial disease have been achieved in the last decade and have opened the path for future developments (Zourob et al 2008). However, many bacterial diseases remain misdiagnosed and, despite advances in antibiotics and the availability of curative interventions, they can often lead to serious conditions and death, with diagnosis being made only retrospectively. One such group of bacteria, where methods for accurate and early diagnosis remain necessary are the "rickettsias *sensu lato*", here referred to as proteobacterias historically included in the *Rickettsiaceae* family, before phylogenetic investigations that placed *Coxiella* and *Bartonella* genus in other taxonomic subdivisions (Brenner et al 1993), (Maurin & Raoult 1999).

Various diseases are attributed to "rickettsias *sensu lato*", including spotted fever group rickettsiosis (SFGR), typhus group (TG), typhus transmitted by cat fleas, varicelliform rickettsiosis, ehrlichiosis, bartonellosis and Q fever, transmitted by arthropods like mites, ticks, lice and fleas, and found in many parts of the world.

Rickettsiosis, especially SFGR, are often misdiagnosed as other endemic diseases, such as dengue or leptospirosis in tropical countries and this can have

serious or fatal results. This is due not only to the similarity of symptoms with other common endemic diseases, but also to the nature of the diagnostic assays currently employed as gold standards in the diagnosis of these conditions.

Thus, in this perspective, we look at the current diagnosis of "rickettsias *sensu lato*", including, besides the genus *Rickettsia*, the *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Bartonella* and *Coxiella* genus with a focus on the potential applications of aptamers in this field.

### Aptamers in bacterial diagnosis

Aptamers are a relatively novel modality that permits recognition of almost any analyte of interest, as they are not based on selection *in vivo*, like antibodies, though they can have similar affinities and specificities to those of antibodies, but much higher than those observed by other reagents selected by combinatorial methods, such as peptides.

Very few aptamers have been described to date as antibacterial agents, such as those capable of binding to, identifying and/or neutralizing *Bacillus anthrax* (Vivekananda & Kiel 2003), a highly pathogenic bacterium that is relatively simple to produce and distribute in the field, but hard to identify and neutralize, as methodologies for that remain scarce. DNA aptamers, capable of binding and inhibiting bacterial tubercle infection, have also been described (Xiaolian & Fan

\* Corresponding author.  
E-mail address: [elemos@ioc.fiocruz.br](mailto:elemos@ioc.fiocruz.br)

2008), as well as aptamers against cytolysin toxin of enterococci (Morrissey & Haeberli 2003), *Bacillus cereus* (Kim et al 2009) and *Salmonella* (Kolovskaya et al 2013). However, the prohibitive cost of aptamers in comparison to traditional antibiotics limits their applicability in this field, except where antibiotic resistance or lack of adequate antibiotics make them the preferred choice.

Nevertheless, aptamers have found a number of diagnostic applications in bacteriology, in addition to various applications of riboswitches. The diagnostic applications cover not only a number of different bacterial targets, presented in table 1, but also a number of different methodologies for bacterial sensing. Thus, aptamers have been selected and used in the diagnosis of *Salmonella*, *E. coli*, *Staphylococcus*, *Campylobacter*, *Listeria* and others (Table). Equally, they have been used in a number of different diagnostic modalities, ranging from enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), aptamer-linked immobilized sorbent assay (ALISA), fibre-optic biosensors, various types of fluorescence detection-based assays, chemiluminescence, electrochemical, potentiometric and impedimetric sensors (Table). Finally, aptamers have been used in a number of other applications with the potential for bacterial detection, such as microarrays, although they have not been employed for this specific purpose to date.

**Table:** Bacteria detected using aptamers with the relevant references

Bacteria	Reference
<i>Salmonella enteritidis</i>	Labib et al 2012, Hyeon et al 2012
<i>Salmonella typhimurium</i>	Maeng et al 2012, Duan et al 2012, Joshi et al 2009
<i>Escherichia coli</i>	Maeng et al 2012, Aguirre et al 2012, Li et al 2011, Zelada-Guillén et al 2010, Bruno et al 2010, Lee et al 2009, So et al 2008
<i>Staphylococcus aureus</i>	Maeng et al 2012, Duan et al 2012, Cao et al 2009
<i>Bacillus anthracis</i>	Cao et al 2009, Bruno, Kiel 1999
<i>Bacillus anthracis</i> spores, <i>Bacillus thuringiensis</i> spores, MS-2 bacteriophage, ovalbumin, botulinum neurotoxin	Cao et al 2009
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Cao et al 2009, Ikanovic et al 2007
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Wang et al 2011
<i>Campylobacter jejuni</i>	Bruno et al 2009
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ohk et al 2010
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Gnanam et al 2008
<i>Francisella tularensis</i>	Vivekananda, Kiel 2006

Thus, although aptamers have not yet appeared in any assays that are considered as gold standards of laboratory practice, they have already shown powerful potential in bacterial diagnosis and, where current protocols are inadequate or retrospective, aptamers will

undoubtedly fulfil their promise as reagents of high applicability.

### **Rickettsiosis *sensu lato* and their diagnosis in humans**

Rickettsiosis "*sensu lato*" are zoonosis caused by  $\alpha$ -proteobacteria of the subgroup 1 (*Rickettsia* and *Ehrlichia*),  $\alpha$ -proteobacteria of the subgroup 2 (*Bartonella*) and  $\gamma$ -proteobacteria (*Coxiella burnetii*). Although all the above species initially belonged to the order *Rickettsiales*, family *Rickettsiaceae*, they are now reorganised and considered as individual families of bacteria. The family *Bartonellaceae*, as well as *Coxiellaceae*, were removed from the order *Rickettsiales*, which now includes two families, the *Anaplasmataceae* and *Rickettsiaceae*. However, they are often all still studied within the field of rickettsiology and for the purpose of this perspective we will consider them together, particularly due to the many common characteristics they present, both in the way they are transmitted and in many of the symptoms they cause (Brenner et al 1993, Maurin & Raoult 1999).

Members of the genus *Rickettsia* may be classified into four groups: (i) typhus group (TG), which includes *R. typhi* and *R. prowazekii*; (ii) spotted fever group (SFG), with more than 25 different species including *R. rickettsii*, *R. conorii*, and *R. parkeri*; (iii) ancestral Rickettsiae group, which includes *R. bellii* and *R. canadensis* and (iv) transitional group, with *R. akari*, *R. australis* and *R. felis*. The clinical features of these rickettsiosis consist of an acute undifferentiated febrile illness, often accompanied by headache, myalgia and nausea, and a maculopapular or vesical rash may be observed a few days after the onset of illness. Rickettsiosis caused by *R. conorii*, *R. africae* and *R. parkeri* present eschar and tender lymphadenopathy. SFG and epidemic typhus are usually associated with more severe symptoms and high mortality in the absence of specific treatment, while endemic typhus is less severe and rarely fatal (Fenollar et al 2007, Fuxelius et al 2007, Valbuena & Walker 2009).

The infection can be diagnosed in a number of different ways; each approach has its advantages and its limitations. The specific laboratory confirmation could be either detection of specific antibodies by serologic tests, of DNA by Polymerase Chain Reaction (PCR), demonstration of the organism in cell culture or histopathology associated with immunohistochemistry techniques. Rickettsial antibodies can be detected by complement fixation, latex agglutination, ELISA and immunofluorescence assay (IFA). IFA is the gold standard for serological diagnostic of rickettsiosis and the diagnostic criteria of recent infection by IFA test are either a 4-fold increase of immunoglobulin IgG or IgM titers in paired samples. The main limitations with serological diagnosis include a usually negative result in the acute phase and an inability to distinguish among various rickettsial species. PCR targeting various

rickettsial genes has been developed, usually targeting citrate synthase gene (*gltA*), gene D *sca4*, surface cell antigen 1 (*sca1*), surface cell antigen 4 (*sca4*), the 17kDa surface antigen gene, and genes for outer membrane proteins A and B, *ompA* and *ompB* (*sca5*) (Prakash et al 2012).

*Ehrlichia* and *Anaplasma* species cause human monocytic ehrlichiosis (HME) and human granulocytic anaplasmosis (HGA), respectively, are transmitted through the bite of an infected tick vector. Clinical presentations of HGA and HME are similar and nonspecific. Fever is followed by headache, myalgias and arthralgias. A rash may be present in 10-30% of cases of HME, but is uncommon in HGA. Laboratory confirmation can be carried out using microscopy for visualisation of bacterial inclusions, mammalian cell culture and IFA. The greatest limitation of IFA is the need of a pair of serum samples from both acute and convalescent stages of the illness. In addition, PCR is currently considered as the most sensitive tool for detecting these proteobacteria during acute infection, targeting primarily the *rrs* (16S rRNA) and *groESL* (heat shock operon) genes (Koebel et al 2012).

Besides *Bartonella bacilliformis*, the agent of Oroya fever and verruga peruana, *Bartonella* genera have also been recognized as important agents causing human disease, including, among others, *B. henselae*, *B. quintana* and *B. elizabethae*, that are associated with a wide spectrum of clinical manifestation, such as cat scratch disease, bacillary angiomatosis, bacillary peliosis, bacteremia, endocarditis, recurrent fever, fever of unknown origin, psychiatric disorders, lymphadenopathy, splenomegaly, osteomyelitis, encephalitis, meningitis, and neuroretinitis (Breitschwerdt et al 2010).

There is not a standard diagnostic laboratory examination for infections caused by *Bartonella* spp. and several techniques must be used to avoid simultaneously false negative results. Diagnostic techniques for infections with *Bartonella* spp. include IFA, culture of the pathogen, histopathological examination of lymph nodes or tissue biopsy of tissue samples, and molecular biology techniques, especially PCR.

*Coxiella burnetii* is a small, obligate intracellular, gram-negative, pleomorphic bacterium and is the cause of Q fever. The main characteristic of Q fever is its clinical polymorphism, and thus diagnosis can only be made by systematic tests. Infection with *C. burnetii* in humans may be asymptomatic, or may present clinical manifestations of acute or chronic Q fever, ranging from limited febrile illness, pneumonia, hepatitis and other forms of risk, such as endocarditis, and meningoencephalitis. Q fever may be detected by serological or molecular methods as well as isolation and histopathology associated with immunohistochemistry techniques. A variety of serological techniques are available, but the IFA has become the reference technique. In recent years, several

PCR-based diagnostic assays have also been developed to detect *C. burnetii* DNA in cell cultures and in clinical samples. These assays use conventional PCR, nested PCR or real-time PCR conditions with Light-Cycler, SYBR Green or TaqMan chemistry (Angelakis & Raoult 2010).

#### **Aptamers in the detection of rickettsias *sensu lato***

So far, it has been noted that serological tests where patient antibodies are being detected in ELISA or IFA assays remain the gold standard, though these are limited both by the waiting time for antibodies to be present in the patient and by the potential cross reactivity, such as that reported between the different species of *Rickettsia* and *Bartonella*. However, aptamers can be raised, and have been raised, directly against bacteria; and they have been used in ELISA type assays, such as those described by Ferreira et al (2008), and for the detection of *Francisella tularensis* in an ALISA. There, *B. henselae* was used as negative control, to show that aptamers were specific for *F. tularensis*, but did not bind to the related *Bartonella* (Vivekananda & Kiel 2006). Such a methodology, which directly recognises antigens from, or whole bacterial cells of, *Rickettsia*, *Bartonella*, *Anaplasma*, *Ehrlichia* and *Coxiella*, would reduce detection time and uncertainty.

Aptamers may also be directly used in the detection of rickettsias using nuclear medicine techniques. The advantage of this technique is the differentiation between bacterial and viral infections, or inflammation due to infection with microbial pathogens and inflammation due to immune response where no microbial invasion is present, as is the case, for example, in autoimmune disorders (Wareham et al 2005). This is achieved through the radiolabelling of antibiotics or other modalities and their subsequent use as imaging agents. Aptamers have already been used as specific antibiotic agents against *Salmonella*, enterococci and anthrax, and they have been previously described in molecular imaging techniques, labelled with radionuclides (Borbas et al 2007, DaPieve et al 2009), for the diagnostic imaging of disease. Thus, they have clearly the potential for selection against rickettsias and use in nuclear medicine techniques to provide more specific information about both the presence and the fate of the bacteria in the body.

Aptamers are also clearly suited to microarray development, and they have already been used in a variety of microarray formats, such as those for the capture of biomarkers in serum to be analysed and identified by Mass Spectrometry (Ahn et al 2010). Oligonucleotide arrays have been used in bacterial detection in a number of formats and for a number of applications. In rickettsiosis, there has been use of microarrays in two different forms. First, based on the whole genome sequence of *R. prowazekii*, the Rickettsial Diseases Division of the U.S. Naval Medical Research Center constructed the first rickettsial microarray with all predicted ORFs. The

genomic compositions of virulent strain and attenuated strain were studied by co-hybridization on this DNA microarray (Naval Medical Research Center website). They have also deposited a patent for the detection and diagnosis of *R. prowazekii* infection by measuring the increased or decreased expression of specific human genes following infection, using DNA microarrays and PCR. This method permits the detection of the rickettsial infection and diagnosis of epidemic typhus earlier than other available methods (Ching, Ge 2004). Another DNA array for *R. prowazekii* has also been generated, which was the first DNA microarray for the analysis of global gene expression changes in *R. prowazekii* under stress conditions (Audia et al 2008). Second, in addition to *R. prowazekii*, other *Rickettsia* microarrays are available based on rickettsial genomic information. The Rickettsia Genome microarray from Agilent Technologies, comprising probes specific to all genes and spacers from *R. prowazekii*, was used by Bechah and collaborators (Bechah et al 2010) for the genomic, proteomic and transcriptomic analysis of *R. prowazekii*. The genome of *R. rickettsii* str. 'Sheila Smith' has also been provided and used for the development of a database containing 3205 oligonucleotides that represent the *R. rickettsii* 'Sheila Smith' transcriptome (OligoArrayDb). Within the same database for pre-designed oligonucleotide microarray probes, available to the research community, are included the sequences for specific strains of *R. rickettsii*, *R. africae*, *R. akari*, *R. bellii*, *R. canadensis*, *R. conorii*, *R. felis*, *R. massiliae*, *R. peacockii*, *R. prowazekii*, and *R. typhi* (OligoArrayDb). These oligonucleotide arrays are based on sequences that hybridise on specific genes of rickettsias. However, oligonucleotide aptamers could be deposited on the array, recognising specific antigens on the surface of the bacterial cells, providing a powerful diagnostic approach.

In recent years much has been accomplished in the development of aptamer-based bioanalytical assays with different detection techniques (Tombelli et al 2005). The use of aptamers in bioanalytical methods is evolving, with the aim of improving analytical performance in terms of detection limits. For example, the biochemical properties of aptamers can be exploited by combining them with nanoparticles in electrochemical and optical sensors.

Numerous biosensors have been described for bacterial identification, based on different recognition elements and detection technologies independently reviewed in Zourob et al (2008).

Though the main biological sensing materials used in biosensor development are the couple antibody/antigen, a number of other recognition elements are currently used, including aptamers (Zourob et al 2008). Other nucleic acid sensors utilise techniques available in common molecular detection assays, such as PCR or real-time PCR and subsequent detection of amplification

products, but in a lab-on-chip format with integrated microfluidic platform systems and transducer/detection methodologies (Lui et al 2009).

Currently available sensor methodologies apply to the detection of rickettsias and a number of patents on sensor development for bacterial detection include rickettsias in the list of pathogenic organisms they cover. Two such examples are available. In one, the design of electrochemical sensors including electrode systems with increased oxygen generation (Simpson et al 2012) is described, where the invention includes the development of systems and methods for electrochemical analyte detection based on increased oxygen generation, and it can be applied to a number of 'contemplated analytes', including rickettsias. In a second, similar case, a transcutaneous analyte sensor is described by Brister et al (2010), for measuring analytes in a host. In this invention, it is specified that the analyte is used in a broad sense, to include, without limitation, reaction products, naturally occurring substances, artificial substances, metabolites and/or reaction products; and it subsequently specifies an extensive, but not limiting, list of chemicals, products and microorganisms, including rickettsia, that the sensor could be applied for, thus protecting the use of such sensors in rickettsial diseases.

Additionally, there are two specific sensors for rickettsia detection under development. One is from the US Office of Scientific and Technical Information (OSTI) of the Department of Energy (DOE), by Andy Hatch, describing the development of the first ultrasensitive microanalytical diagnostic method for rickettsial pathogens (Hatch 2013). This sensor uses *in situ* polymerised porous polymer monoliths both as size exclusion elements for capturing and processing rickettsial infected cells from a sample, and as a photopatternable framework for grafting high densities of functionalised antibodies and fluorescent particles. With this, they have achieved selective capture, identification of bacterial cells with at least an order of magnitude improvement in the detection limits of currently available methodologies and reduced detection times (Hatch 2013). The second current development of rickettsial sensors is again from the US, in a programme for the development of 'Handheld Aptamer-Magnetic Bead-Quantum Dot Sensor for Rickettsiae' from the US Department of Defence (Small Business Innovation Research SBIR website). In this programme, they are aiming to use a previously developed sensor format for *Campylobacter jejuni* developed by Operational Technologies, with a rapid and ultrasensitive one-step plastic adherent DNA aptamer-magnetic bead plus aptamer-quantum dot sandwich assay to detect the bacteria in a handheld battery-operated fluorimeter sensor that can be operated under field conditions. They have proposed to develop aptamers against a mixture of isolated rickettsias and to substitute those used for the *Campylobacter* detection

on the same sensor, demonstrating the applicability of aptamer sensor development for rickettsial diseases.

### CONCLUSION

Aptamers are flexible, stable and economical recognition elements that can be selected against any target of interest and integrated into a variety of technologies for bacterial detection in general and rickettsial detection in particular. They offer unique benefits compared to other targeting agents, in terms of affinity and selectivity, ease of selection and synthesis, as well as temperature stability and small size. Aptamers have been utilised extensively in the development of sensors for bacterial detection. There is an extensive list of bacteria that have been used as aptamer targets (see Table 1) and a number of diagnostic technologies where aptamers have been successfully incorporated. Aptamers can be used directly in the more established and well-accepted ELISA and immunofluorescence assays; but they also offer the possibility of direct recognition of the antigen in the blood/serum, rather than indirect identification of patient antibodies, which is the current practice. They can also be used on lab-on-chip approaches that include standard techniques but on a nanoscale sensor. Finally, aptamers have already been described for rickettsial diseases in the development of novel sensors that could provide a point-of-care diagnosis of rickettsiosis *sensu lato*, which could reduce waiting times, uncertainty of results and misdiagnosis for other endemic diseases with similar clinical profile.

### REFERENCES

- Aguirre SD, Ali MM, Kanda P, Li Y 2012. Detection of bacteria using fluorogenic DNazymes. *J. Vis. Exp.* 28: pii 3961.
- Ahn JY, Lee SW, Kang HS, Jo M, Lee D, et al 2010. Aptamer microarray mediated capture and mass spectrometry identification of biomarker in serum samples. *J Proteome Res* 9: 5568-5573.
- Angelakis E, Raoult D 2010. Review Q fever. *Vet Microbiol* 140: 297-309.
- Audia JP, Patton MC, Winkler HH, 2008. DNA Microarray Analysis of the Heat Shock Transcriptome of the Obligate Intracytoplasmic Pathogen *Rickettsia prowazekii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 7809-7812.
- Bechah Y, Karkouri KE, Mediannikov O, 2010. Genomic, proteomic, and transcriptomic analysis of virulent and avirulent *Rickettsia prowazekii* reveals its adaptive mutation capabilities. *Genome Res.* 20: 655-663.
- Borbas KE, Ferreira CSM, Perkins A, Bruce JI, Missailidis S, 2007. Design and synthesis of mono- and multimeric targeted radiopharmaceuticals based on novel cyclen ligands coupled to anti-MUC1 aptamers for the diagnostic imaging and targeted radiotherapy of cancer. *Bioconj Chem* 18: 1205-1212.
- Breitschwerdt EB, Maggi RG, Chomel BB, Lappin MR, 2010. Bartonellosis: an emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings. *J. Vet. Emerg. Crit. Care.* 20: 8-30.
- Brenner DJ, O'Connor SP, Winkler HH, Steigerwalt AG, 1993. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella Quintana* comb. Nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. Nov., *B. elizabethae* comb. Nov., and to remove the Family *Bartonellaceae* from to order *Rickettsiales*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 43: 711-715.
- Brister M, Neale PV, Brauker J 2010. *Transcutaneous Analyte sensor*. US 2010/0174164 A1. (Patent)
- Bruno JG, Carrillo MP, Phillips T, Andrews CJ 2010. A novel screening method for competitive FRET-aptamers applied to *E. coli* assay development. *J. Fluoresc.* 20: 1211-1223.
- Bruno JG, Kiel JL 1999. In vitro selection of DNA aptamers to anthrax spores with electrochemiluminescence detection. *Biosens. Bioelectron.* 14: 457-464.
- Bruno JG, Phillips T, Carrillo MP, Crowell R 2009. Plastic-adherent DNA aptamer-magnetic bead and quantum dot sandwich assay for *Campylobacter* detection. *J. Fluoresc.* 19:427-435.
- Cao X, Li S, Chen L 2009. Combining use of a panel of ssDNA aptamers in the detection of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* 37: 4621-4628.
- Ching WM, Ge H, 2004. Diagnostic assay for *Rickettsia prowazekii* disease by detection of responsive gene expression. *USPTO Application #20060099628A1*. (Patent)
- DaPieve C, Perkins AC, Missailidis S 2009. Anti-MUC1 aptamers: radiolabelling with <sup>99m</sup>Tc and biodistribution in MCF-7 tumour-bearing mice. *Nucl. Med. Biol.* 36: 703-710.
- Duan N, Wu S, Zhu C, 2012. Dual-color upconversion fluorescence and aptamer-functionalized magnetic nanoparticles-based bioassay for the simultaneous detection of *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *Anal. Chim. Acta* 723:1-6.
- Fan M, McBurnett SR, Andrews CJ, 2008. Aptamer selection express: a novel method for rapid single-step selection and sensing of aptamers. *J. Biomol. Tech.* 19: 311-319.
- Fenollar F, Fournier PE, Raoult D 2007. Diagnostic Strategy of Rickettsioses and Ehrlichioses. In: Parola P, Raoult D. *Rickettsial Diseases*, Informa Healthcare USA, New York, p: 315-330.
- Ferreira CSM, Papamichael K, Guilbault G 2008. DNA aptamers against MUC1: Design of aptamer-antibody sandwich ELISA for the early diagnosis of epithelial tumours. *Anal. Bioanal. Chem.* 390:1039-1050.
- Fuxelius HH, Darby A, Min CK, Cho NH, Andersson SG 2007. The genomic and metabolic diversity of *Rickettsia*. *Res Microbiol.* 158: 745-53.
- Gnanam AJ, Hall B, Shen X 2008. Development of aptamers specific for potential diagnostic targets in

- Burkholderia pseudomallei*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102 (Suppl 1), S55-57.
- Hatch A. Accessed March 2013. Ultrasensitive microanalytical diagnostic methods for rickettsial pathogens. Available: [http://www.osti.gov/bridge/product.biblio.jsp?osti\\_id=1035853](http://www.osti.gov/bridge/product.biblio.jsp?osti_id=1035853).
- Hyeon JY, Chon JW, Choi IS 2012. Development of RNA aptamers for detection of *Salmonella* Enteritidis. *J. Microbiol. Methods* 89: 79-82.
- Ikanovic M, Rudzinski WE, Bruno JG 2007. Fluorescence assay based on aptamer-quantum dot binding to *Bacillus thuringiensis* spores. *J. Fluoresc.* 17: 193-199.
- Joshi R, Janagama H, Dwivedi HP 2009. Selection, characterization, and application of DNA aptamers for the capture and detection of *Salmonella enterica* serovars. *Mol. Cell. Probes* 23: 20-28.
- Kim SK, Sims CL, Wozniak SE, 2009. Antibiotic resistance in bacteria: novel metalloenzyme inhibitors. *Chem. Biol. Drug Des.* 74: 343-348.
- Koebel C, Kern A, Edouard S 2012. Human granulocytic anaplasmosis in eastern France: clinical presentation and laboratory diagnosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 72: 214-218.
- Kolovskaya OS, Savitskaya AG, Zamay T, 2013. Development of Bacteriostatic DNA Aptamers for *Salmonella*. *J. Med. Chem.* 56: 1564-1572.
- Labib M, Zamay AS, Kolovskaya OS, 2012. Aptamer-based impedimetric sensor for bacterial typing. *Anal. Chem.* 84: 8114-8117.
- Lee HJ, Kim BC, Kim KW, 2009. A sensitive method to detect *Escherichia coli* based on immunomagnetic separation and real-time PCR amplification of aptamers. *Biosens. Bioelectron.* 24:3550-3555.
- Li H, Ding X, Peng Z, 2011. Aptamer selection for the detection of *Escherichia coli* K88. *Can. J. Microbiol.* 57: 453-459.
- Lui C, Cady NC, Batt CA 2009. Nucleic Acid-based Detection of Bacterial Pathogens Using Integrated Microfluidic Platform Systems. *Sensors* 9: 3713-3744.
- Maeng JS, Kim N, Kim CT, 2012. Rapid detection of food pathogens using RNA aptamers-immobilized slide. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 12: 5138-5142.
- Maurin M, Raoult D, 1999. Q Fever. *Clin Microbiol Rev* 12: 518-553.
- Morrissey D, Haeberli P, 2003. Nucleic acid mediated inhibition of enterococcus infection and cytolysin toxin activity. WO2003106476 (Patent).
- Ohk SH, Koo OK, Sen T, Yamamoto CM, Bhunia AK 2010. Antibody-aptamer functionalized fibre-optic biosensor for specific detection of *Listeria monocytogenes* from food. *J. Appl. Microbiol.* 109: 808-817.
- Prakash JAJ, Lal TS, Rosemol V 2012. Molecular detection and analysis of spotted fever group Rickettsia in patients with fever and rash at a tertiary care center in Tamil Nadu, India. *Pathog. Glob. Health.* 106: 40-45.
- Simpson PC, Petisce JR, Carr-Brendel VE, Brauker JH 2012. Electrode systems for electrochemical sensors. US20120228134 A1 (Patent).
- So HM, Park DW, Jeon EK, 2008. Detection and titer estimation of *Escherichia coli* using aptamer-functionalized single-walled carbon-nanotube field-effect transistors. *Small.* 4:197-201.
- Tombelli S, Minunni M, Mascini M 2005. Analytical application of aptamers. *Biosens. Bioelectron.* 20: 2424-2434.
- Valbuena G, Walker DH, 2009. Infection of the endothelium by members of the order Rickettsiales. *Thromb Haemost.* 102:1071-1079.
- Vivekananda J, Kiel JL, 2003. Methods and compositions for aptamers against anthrax. US6569630, (Patent).
- Vivekananda J, Kiel JL, 2006. Anti-*Francisella tularensis* DNA aptamers detect tularemia antigen from different subspecies by Aptamer-Linked Immobilized Sorbent Assay. *Lab. Invest.* 86:610-618.
- Wang KY, Zeng YL, Yang XY, Li WB, Lan XP 2011. Utility of aptamer-fluorescence in situ hybridization for rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30: 273-278.
- Wareham D, Michael J, Das S 2005. Advances in Bacterial Specific Imaging. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48(Special):145-152.
- Xiaolian Z, Fan C, 2008. CN101109013, (Patent).
- Zelada-Guillén GA, Bhosale SV, Riu J, Rius FX, 2010. Real-time potentiometric detection of bacteria in complex samples. *Anal. Chem.* 82: 9254-9260.
- Zourob M, Elwary S, Turner A, 2008. Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems. *SpringerLink.* 1002p.

Lopes LB, Guterres A, Rozental T, Oliveira RC, Mares-Guia MA, Fernandes J, Figueredo JF, Anschau I, Jesus S, Almeida ABMV, Silva VC, Via AVGM, Bonvicino CR, D'Andrea PS, Barreira JD and Lemos ERS. 2014. *Rickettsia bellii*, *Rickettsia amblyommii*, and Laguna Negra hantavirus in an Indian reserve in the Brazilian Amazon. *Parasites & Vectors*, 7:191 (available at <http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/191>).

de Barros Lopes et al. *Parasites & Vectors* 2014, 7:191  
<http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/191>



RESEARCH

Open Access

## *Rickettsia bellii*, *Rickettsia amblyommii*, and Laguna Negra hantavirus in an Indian reserve in the Brazilian Amazon

Lívia de Barros Lopes<sup>1</sup>, Alexandro Guterres<sup>1\*</sup>, Tatiana Rozental<sup>1</sup>, Renata Carvalho de Oliveira<sup>1</sup>, Maria Angélica Mares-Guia<sup>1</sup>, Jorlan Fernandes<sup>1</sup>, José Ferreira Figueredo<sup>2</sup>, Inês Anschau<sup>2</sup>, Sebastião de Jesus<sup>2</sup>, Ana Beatriz M V Almeida<sup>2</sup>, Valéria Cristina da Silva<sup>3</sup>, Alba Valéria Gomes de Melo Via<sup>3</sup>, Cibele Rodrigues Bonvicino<sup>4,5</sup>, Paulo Sérgio D'Andrea<sup>4</sup>, Jairo Dias Barreira<sup>1,6</sup> and Elba Regina Sampaio de Lemos<sup>1</sup>

### Abstract

**Background:** The purpose of this study was to identify the presence of rickettsia and hantavirus in wild rodents and arthropods in response to an outbreak of acute unidentified febrile illness among Indians in the Halataikwa Indian Reserve, northwest of the Mato Grosso state, in the Brazilian Amazon. Where previously surveillance data showed serologic evidence of rickettsia and hantavirus human infection.

**Methods:** The arthropods were collected from the healthy Indian population and by flagging vegetation in grassland or woodland along the peridomestic environment of the Indian reserve. Wild rodents were live-trapped in an area bordering the reserve limits, due the impossibility of capturing wild animals in the Indian reserve. The wild rodents were identified based on external and cranial morphology and karyotype. DNA was extracted from spleen or liver samples of rodents and from invertebrate (tick and louse) pools, and the molecular characterization of the rickettsia was through PCR and DNA sequencing of fragments of two rickettsial genes (gltA and ompA). In relation to hantavirus, rodent serum samples were serologically screened by IgG ELISA using the Araraquara-N antigen and total RNA was extracted from lung samples of IgG-positive rodents. The amplification of the complete S segment was performed.

**Results:** A total of 153 wild rodents, 121 louse, and 36 tick specimens were collected in 2010. Laguna Negra hantavirus was identified in *Calomys callidus* rodents and *Rickettsia bellii*, *Rickettsia amblyommii* were identified in *Amblyomma cajennense* ticks.

**Conclusions:** Zoonotic diseases such as HCPS and spotted fever rickettsiosis are a public health threat and should be considered in outbreaks and acute febrile illnesses among Indian populations. The presence of the genome of rickettsias and hantavirus in animals in this Indian reserve reinforces the need to include these infectious agents in outbreak investigations of febrile cases in Indian populations.

**Keywords:** Indian population, *Rickettsia bellii*, *Rickettsia amblyommii*, Laguna negra virus

### Background

More than 800,000 Indians from 220 ethnic groups speaking 180 languages live in Brazil. Evaluation of indigenous health is very complex, due to demographic and epidemiological differences, especially with some groups that still live in relative isolation without interaction with

the prevalent national society [1]. Social changes and economic and environmental factors continue to affect the profile of the Indians' health, contributing to a higher occurrence of infectious diseases than in other ethnic groups [2,3].

In 2009, the Bureau of Health of the State of Mato Grosso (BHSMT) investigated an outbreak of an unknown acute febrile illness among Indians in the reserve located in the Parecis region, where over 172 cases of hantavirus cardiopulmonary syndrome (HCPS) have been

\* Correspondence: [guterres@ioc.fiocruz.br](mailto:guterres@ioc.fiocruz.br)

<sup>1</sup>Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ 21045-900, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 de Barros Lopes et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



identified since 1999. Blood samples from 59 of 530 apparently healthy Indians were collected; five (8%) were positive for anti-hantavirus IgG antibodies. In addition, as ticks and tick bites were reportedly prevalent in this Indian reserve, serological analysis was performed; IgG antibodies anti-spotted fever group rickettsia (SFGR), *Bartonella* spp., and *Ehrlichia* spp. were detected in sera from 12 (8%), five (8%), and four (6.8%) Indians, respectively. Based on these findings, the objective of this study was to collaborate with the health surveillance system and identify SFGR and hantavirus circulating in arthropods and wild rodents collected in this Indian area.

#### Methods

In 2010, in response to an outbreak of acute unidentified febrile illness among Indians in the Halataikwa Indian Reserve, northwest of the Mato Grosso state, a study was carried out in two areas of the Parecis micro-region of the Brazilian Amazon in Mato Grosso - municipalities of Comodoro (13° 39' 46" S 59° 47' 09" O) and Sapezal (13° 32' 33" S 58° 48' 51" O) (Figure 1).

#### Arthropod samples

The arthropods were collected from the healthy Indian population and by flagging vegetation in grassland or woodland along the peridomestic environment of the Indian reserve, municipality of Comodoro, by the Indians' own health service with the collaboration of BHSMT. The identification procedure was done on the basis of

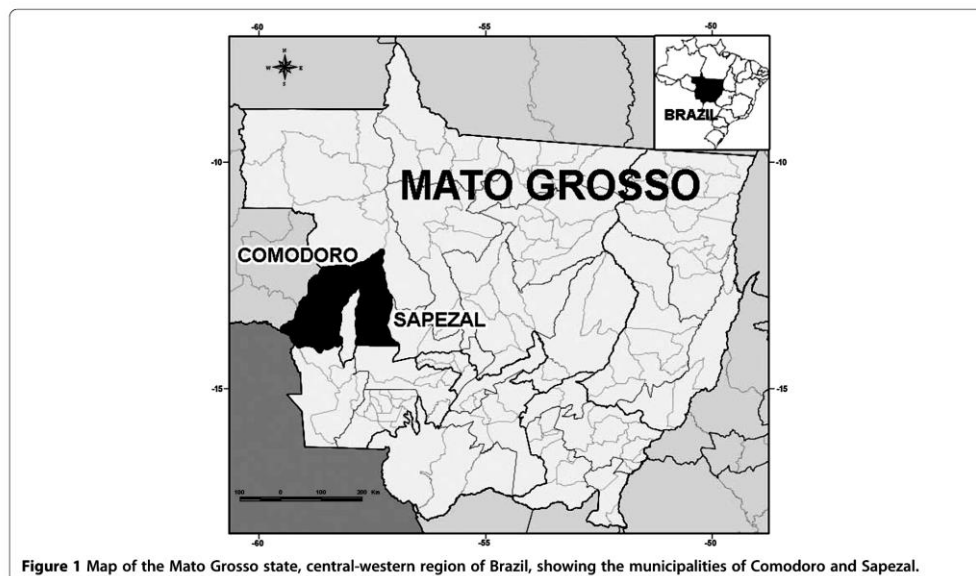
morphologic features using standard taxonomic keys [4] and the arthropods were subsequently shipped on dry ice to the Laboratory of Hantaviruses and Rickettsioses, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ.

#### Small-mammals samples

Eco-epidemiological study was conducted in an area bordering the reserve limits in the municipality of Sapezal, due the impossibility of capturing wild animals in the Indian reserve. The wild rodents were identified based on external and cranial morphology and karyotype [5-7]. Voucher specimens were deposited in the collection of the National Museum, Federal Universidad of Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Blood and tissue samples from the wild rodents were obtained in accordance with recommended safety procedures [8], after authorization by the Brazilian Institute for the Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA) under license number 60 8054/2008.

#### Rickettsia detection

DNA was extracted from spleen or liver samples of rodents and from invertebrate (tick and louse) pools, ranging from one (engorged adult) to 44 (larvae) specimens, by using a QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) following the instructions of the manufacturer. The polymerase chain reaction (PCR) was performed using oligonucleotide primers to amplify the partial citrate synthase gene (*gltA*) of genus *Rickettsia* (RpCS877 and RpCS1258) and outer membrane protein gene (*ompA*) fragments of



**Figure 1** Map of the Mato Grosso state, central-western region of Brazil, showing the municipalities of Comodoro and Sapezal.

spotted fever group *Rickettsia*—SFGR (Rr190-70 and Rr190-602), published previously [9,10].

#### Hantavirus detection

In relation to hantavirus, rodent serum samples were serologically screened by IgG ELISA using the Araraquara-N antigen [11]. Total RNA was extracted from lung samples of IgG-positive rodents using Trizol with the Purelink Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen®, San Diego, CA, USA). In addition, viral RNA was extracted from lung samples of rodents for which there were no blood samples. The amplification of the complete S segment was performed according to Guterres and collaborators [12].

#### DNA sequencing and phylogenetic analyses

For DNA purification, the Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega, Corp., Madison, WI, USA) was used according to the manufacturer's recommendations, and strands were directly sequenced. In the sequencing reaction, the BigDye Terminator™ version 3.1 Cycle Sequencing® Kit (Applied Biosystems) was used according to the manufacturer's recommendations in an automatic sequencer (Applied Biosystems, ABI PRISM 3130X model, Foster City, CA, USA). Nucleotide sequences were analyzed using MEGA5 software [13], and a consensus sequence was derived from contiguous sequences assembled with the same software.

Multiple sequence alignments were done with sequences obtained from this study and sequences from GenBank using the MUSCLE, in the SeaView version 4 software [14]. The rickettsia phylogenetic tree was constructed using the maximum likelihood (ML) implemented in MEGA5 software. The support for the tree nodes was calculated with 1,000 bootstrap replicates.

Phylogenetic relationships among the hantaviruses were estimated by the Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method implemented in MrBayes version 3.1.2 [15], using the GTR + G model of sequence evolution, as determined by the jModelTest version 2 [16]. The Bayesian analysis consisted of two simultaneous independent runs of 3 million MCMC generations (burn-in of 25%).

#### Results

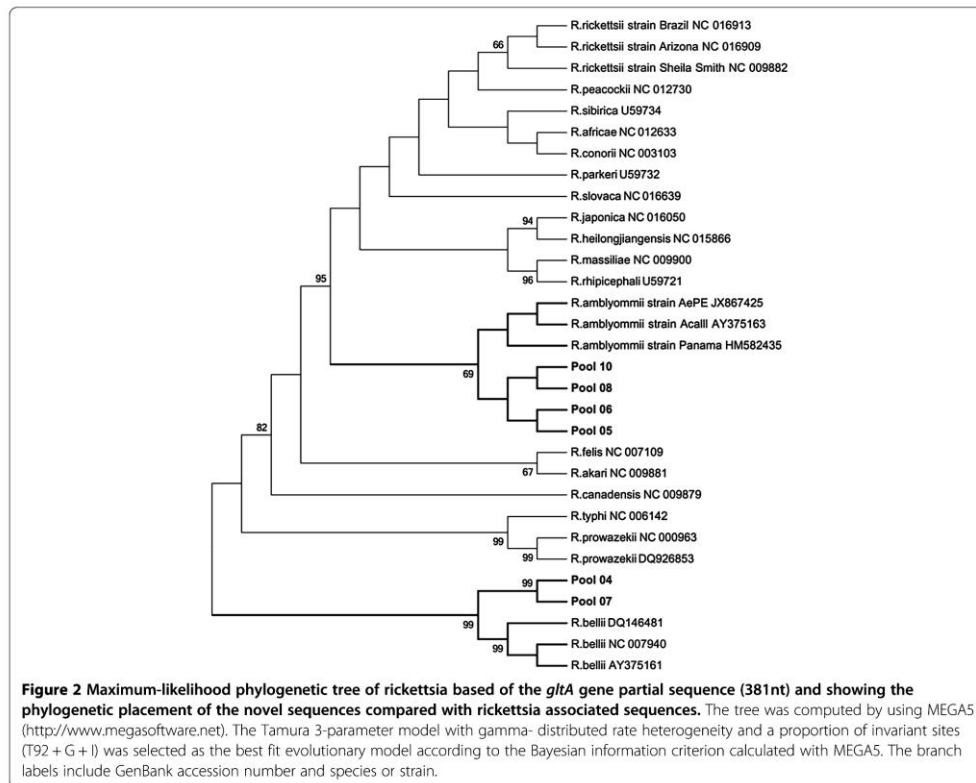
Two ticks and 121 louse specimens, removed from the asymptomatic Indian population, were taxonomically classified as *Amblyomma* nymphs and *Pediculus humanus* (81 adults and 40 nymphs), respectively. Additionally, 34 ticks were collected by flagging vegetation in grassland or woodland along the peridomestic environment of the Indian reserve—10 *Amblyomma cajennense* (adults), 12 *Amblyomma* larvae, and 12 *Amblyomma* nymphs.

Seven of 16 (44%) tick DNA pools were found to be infected with *Rickettsia*; one was composed of *Amblyomma*

larvae, two of *Amblyomma* nymphs, and four of *A. cajennense* (adults), all were collected on the ground along the peridomestic environment of the Indian reserve (Table 1). The sequences generated for *gltA* (381bp) and *ompA* genes (510bp) were analyzed using BLASTn searches of GenBank sequences. The DNA sequence analysis of five tick pools had 99% (*ompA*) and 99% (*gltA*) similarity to gene sequences of *Rickettsia amblyommii* [GenBank: GQ891955 and AY375163, respectively] and DNA of two tick pools had 99% (*gltA*) similarity to gene sequences of *Rickettsia bellii* [GenBank: DQ146481]. In the rickettsia phylogenetic tree of the *gltA* gene, the sequences obtained from pools 05, 06, 08, and 10 formed a monophyletic clade with sequences of *R. amblyommii*, while the sequences obtained from pools 04 and 07 formed a monophyletic clade with sequences of *R. bellii* available in the GenBank (Figure 2). In the phylogenetic tree of the *ompA* gene, five tick DNA pools (05, 06, 08,

**Table 1 Molecular analysis of ectoparasites removed from the asymptomatic Indian population and of the environment**

Pools	Species (amount)	Collected	<i>gltA</i>	<i>OmpA</i>
Pool 1	<i>A. cajennense</i> (01)	Environment	-	-
Pool 2	<i>A. cajennense</i> (01)	Environment	-	-
Pool 3	<i>A. cajennense</i> (01)	Environment	-	Positive
Pool 4	<i>Amblyomma</i> larvae (12)	Environment	Positive	-
Pool 5	<i>Amblyomma</i> nymphs (06)	Environment	Positive	Positive
Pool 6	<i>Amblyomma</i> nymphs (05)	Environment	Positive	Positive
Pool 7	<i>A. cajennense</i> (01)	Environment	Positive	-
Pool 8	<i>A. cajennense</i> (01)	Environment	Positive	Positive
Pool 9	<i>A. cajennense</i> (01)	Environment	-	-
Pool 10	<i>A. cajennense</i> (01)	Environment	Positive	Positive
Pool 11	<i>A. cajennense</i> (01)	Environment	-	-
Pool 12	<i>P. humanus</i> nymphs (08)	Human (Head)	-	-
Pool 13	<i>P. humanus</i> nymphs (08)	Human (Head)	-	-
Pool 14	<i>P. humanus</i> nymphs (08)	Human (Head)	-	-
Pool 15	<i>P. humanus</i> nymphs (08)	Human (Head)	-	-
Pool 16	<i>P. humanus</i> nymphs (08)	Human (Head)	-	-
Pool 17	<i>P. humanus</i> (04)	Human (Head)	-	-
Pool 18	<i>P. humanus</i> (12)	Human (Head)	-	-
Pool 19	<i>Amblyomma</i> nymphs (01)	Human (body)	-	-
Pool 20	<i>Amblyomma</i> nymphs (01)	Human (body)	-	-
Pool 21	<i>Pediculus humanus</i> (10)	Human (Head)	-	-
Pool 22	<i>P. humanus</i> (11)	Human (Head)	-	-
Pool 23	<i>P. humanus</i> (44)	Human (Head)	-	-
Pool 24	<i>Amblyomma</i> nymphs (01)	Environment	-	-
Pool 25	<i>A. cajennense</i> (01)	Environment	-	-
Pool 26	<i>A. cajennense</i> (01)	Environment	-	-



10, and 03) formed a monophyletic clade with sequences of *R. amblyommii* (Figure 3). All 10 louse DNA pools were PCR negative.

A total of 153 wild rodents were captured: *Calomys callidus* (65); *Necomys lasiurus* (60); *Oligoryzomys utiaritensis* (9); *Rattus rattus* (8); *Hylaeamys megacephalus* (4), *Oligoryzomys mottogrossae* (1), *Oecomys sp.* (3), and *Calomys sp.* (3). In order to investigate the presence of rickettsial infections in these small mammals, DNA was extracted from spleen or liver samples of 136 rodents for which there were tissue samples. Wild rodents were submitted to molecular analysis for genus *Rickettsia* and were PCR negative to *gltA* and *ompA* genes.

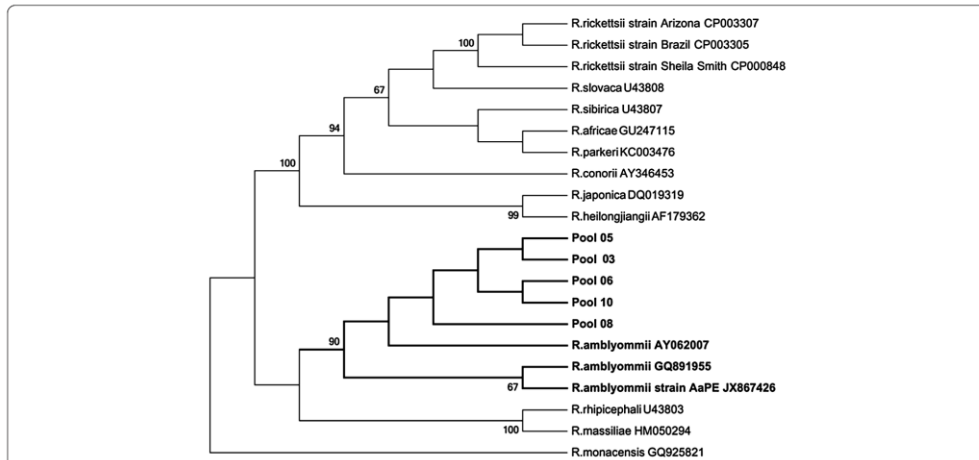
One hundred rodents were submitted to serology for anti-hantavirus antibodies, and one *O. utiaritensis* was reactive against the Araraquara-N antigen. The lung tissue sample of this rodent was submitted to molecular detection (RT-PCR), but it was not possible to recover the viral RNA. In addition, of 53 rodents for which there

were no blood samples, one male specimen of the species *C. callidus* was RT-PCR positive. The comparison of the complete S segment with other known hantaviruses showed the highest degree of similarity, at 99% and 98% [GenBank: JX443686 and FJ816031, respectively], with Laguna Negra virus (LANV) from a human case of HCPS from Mato Grosso [17,18]. The sequence obtained was also similar (86%) to LANV [Genbank: AF005727] identified in *Calomys laucha* from Paraguay [19].

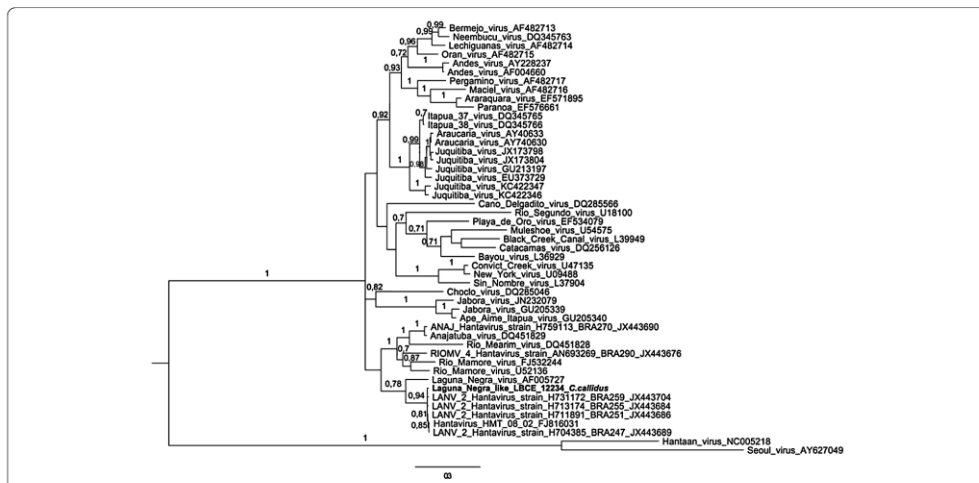
According to phylogenetic inferences, it was possible to check the formation of a well-supported monophyletic clade of our sequence against sequences of LANV available in GenBank. The sequences of LANV from Brazil are closely related to them (Figure 4).

## Discussion

The role of ticks in the transmission of Rocky Mountain spotted fever (RMSF) was first documented by King and also by Ricketts in 1906, and since then several species of ticks have been identified as reservoirs of rickettsiae



**Figure 3** Maximum likelihood phylogenetic tree of rickettsia based on the *ompA* gene partial sequence (510nt) and showing the phylogenetic placement of the novel sequences compared with rickettsia associated. The tree was computed by using MEGA5 (<http://www.megasoftware.net>). The Tamura 3-parameter model with gamma-distributed rate heterogeneity and a proportion of invariant sites (T92 + G + I) was selected as the best fit evolutionary model according to the Bayesian information criterion calculated with MEGA5. The branch labels include GenBank accession number and species or strain.



**Figure 4** Phylogenetic relationships among hantaviruses based on Bayesian analysis of genetic distances generated from comparisons of a 950nt fragment of the nucleocapsid gene sequences. The scale bars indicate an evolutionary distance of 0.3 substitutions per position in the sequence. The numerical value  $\geq 0.7$  at the node indicates the posterior probability (pp) replicates that supported by the interior branch. The branch labels include GenBank accession number and viral species or strain.

that are pathogenic and non-pathogenic to humans. In this study, *R. bellii* and *R. amblyommii* genomes were detected in *A. cajennense* ticks collected from the Indian environment. These species of the *Rickettsia* were previously identified in several species of *Amblyomma* sp. ticks in northern Brazil, Peru, and Argentina's Chaco province [20-23]. Although *R. amblyommii* is considered a non-pathogenic rickettsia, a recent study suggested that this species might be responsible for several cases of RMSF-like disease [24]. As unknown acute febrile illness has been continually reported among Indians in the Brazilian northern region, and as serological tests may have detected cross-reactive antibodies to several SFGR, the possibility of occurrence of human spotted fever in this Indian area should be considered.

*Rickettsia bellii*, a member of the ancestral rickettsiae group with unrecognized pathogenicity for humans, have been reported in larvae of *Amblyomma varium* found in infested Amazonian birds caught in Peru [25] and in a host-seeking male of *A. tigrinum* in Argentina, where ixodid ticks collected from vegetation and from humans and wild and domestic mammals in a rural area in the semi-arid Chaco province were found infected with an SFGR of unknown pathogenicity [22]. In this scenario, even if the pathogenicity of *R. bellii* and *R. amblyommii* has not been demonstrated or is unknown, the presence of ectoparasites infected with two species of rickettsiae in the Indian reserve may be a threat.

In relation to HCPS, since its first description in Navajo Indians in the United States, several studies have demonstrated the high incidence of hantavirus infection in the Indian populations throughout the American continent [26]. In 1998, a study conducted in Indian communities in northern Argentina and western Paraguay showed seroreactivity to hantavirus antibodies of 17.1% and 40.4%, respectively [27]. Later, two additional studies on hantavirus infection in the Indian population, also conducted in Paraguay, one in the western region and another in the eastern region, showed prevalence rates of 45.2% and 17.8%, respectively, higher rates than are usually observed in the general population (3.5%, 4.7%). In this sense, their habits, the forests or wild environments in which they dwell, their precarious housing with food storage in places that promote contact with animals and their excreta, among other factors, subject Indians to a greater exposure to hantavirus [28-31].

Our study also revealed the presence of LANV in a *C. callidus* rodent captured in an area bordering the reserve limits in the Sapezal municipality. Genetic analysis revealed the highest degree of similarity, at 99% and 98% with LANV (GenBank: JX443686 and FJ816031, respectively), with human cases of HCPS from Mato Grosso [17,18,32]. The LANV had been first described as a cause of HCPS in the Chaco region, Paraguay, in 1997 in a

study that also identified the *Calomys laucha* rodent as the primary reservoir of this virus in Paraguay [19]. In 2004, LANV was identified for the first time in Argentina, recovered from human cases and from *C. callosus* samples. The high sequence identity between human and rodent samples implicated *C. callosus* as the primary rodent reservoir for LANV in Argentina [33]. Subsequently, in 2005, in the city of Concepción, Bolivia, where a non-fatal case of HCPS was reported, LANV was identified in *C. callosus* rodents. The sequencing reaction of the amplified segment showed an 87-88% similarity with LANV and a 99% match with the viral sequences obtained from the patient with HCPS in that region [18]. A recently published study associated LANV with HCPS in Mato Grosso state, Brazil, and cited a previously unidentified potential host, the *C. callidus* rodent corroborating our findings.

In our study, it was possible to perform the sequencing of a complete S segment of LANV in Brazil. The identification of LANV associated with another rodent species of the genus *Calomys* reinforces the idea that many hantaviruses, including LANV, cannot be strictly associated with only one species of rodent reservoir. The capacity of *C. callidus* to harbor LANV and its role as a reservoir are still unclear and new studies need to be conducted in order to better understand the relationship dynamics involving *C. callidus* and LANV.

## Conclusions

Zoonotic diseases such as HCPS and spotted fever rickettsiosis are a public health threat and should be considered in outbreaks and acute febrile illnesses among Indian populations. The interrelationship of the Indian population with rodents and arthropods in forests or wild environments and their precarious housing, among other factors, increases the risk of occurrence of this zoonosis with high mortality rates. Therefore, our study reinforces the importance of the knowledge concerning the geographical distribution and prevalence of zoonotic diseases in Indian reserve areas.

## Competing interests

No competing financial interests exist. The authors have no conflicts of interest or disclosures to make concerning this work.

## Authors' contributions

JFF, IA, SJ, ABMVA, VCS, AVGMV performed tick and rodents field study and revised the manuscript. LBL and AG lab experiments, processed the data, and drafted the manuscript. TR, RCO, MAMG and JF conducted lab experiments, processed the data, and revised the manuscript. CRB and PSD performed identification of the rodents and revised the manuscript. JDB performed identifications of the arthropods and revised the manuscript. ERSL contributed to study design, field study, data analysis and interpretation, and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

The authors thank the Public Health Secretary of the state of Mato Grosso for their assistance in the rodent capture and Indian blood collection. Financial support: Fiocruz and CAPES.

#### Author details

<sup>1</sup>Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ 21045-900, Brazil. <sup>2</sup>Fundação Nacional de Saúde, FUNASA-DSEI, Mato Grosso, Brazil. <sup>3</sup>Secretaria Estadual de Saúde, SES, Mato Grosso, Brazil. <sup>4</sup>Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>5</sup>Programa de Genética, Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>6</sup>Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, UNIRIO, Rio de Janeiro, Brazil.

Received: 24 January 2014 Accepted: 8 April 2014

Published: 17 April 2014

#### References

1. National Foundation of Indian. [http://www.funai.gov.br/index.php/indios-no-brasil/quem-sao]
2. Coimbra JCEA, Santos RV: **Emerging health needs and epidemiological research in indigenous peoples in Brazil.** In *Lost Parad Ethics Res Publ*. Edited by Salzano FM, Hurtado AM. New York, USA: Oxford University Press; 2004:89–109.
3. Santos RV, Coimbra CEA Jr: *As causas sociais das iniquidades em saúde no Brasil. Relatório final da Comissão Nacional sobre Determinantes Sociais da Saúde*; 2013:121–p. 124. Available from: <http://www.cnds.fiocruz.br/pdf/home/relatorio.pdf>.
4. Aragão H, Fonseca F: **Notas de Ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1961, **59**:115–130.
5. Bonvicino CR, D'Andrea PS, Cerqueira R, Seuanez HN: **The chromosomes of Nectomys (Rodentia, Cricetidae) with 2n = 52, 2n = 56, and interspecific hybrids (2n = 54).** *Cytogenet Cell Genet* 1996, **73**:190–193.
6. Bonvicino CR, Otazu IB, D'Andrea PS: **Karyologic evidence of diversification of the genus Thrichomys (Rodentia, Echimyidae).** *Cytogenet Genome Res* 2002, **97**:200–204.
7. Bonvicino CR, Moreira MA: **Molecular phylogeny of the genus Oryzomys (Rodentia: Sigmodontinae) based on cytochrome b DNA sequences.** *Mol Phylogenet Evol* 2001, **18**:282–292.
8. Mills JN, Childs JE, Ksiazek TG, Peters CJ: *Methods for Trapping and Sampling Small Mammals for Virologic Testing*. Atlanta, GA: Department of Health and Human Services; 1995:71.
9. Wood DO, Williamson LR, Winkler HH, Krause DC: **Nucleotide sequence of the Rickettsia prowazekii citrate synthase gene.** *J Bacteriol* 1987, **169**:3564–3572.
10. Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD: **Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes.** *J Bacteriol* 1991, **173**:1576–1589.
11. Figueiredo LTM, Moreli ML, Borges AA, de Figueiredo GG, Badra SJ, Bisordi I, Suzuki A, Capria S, Padula P: **Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on Araraquara virus recombinant nucleocapsid protein.** *Am J Trop Med Hyg* 2009, **81**:273–276.
12. Guterres A, de Oliveira RC, Fernandes J, D'Andrea PS, Bonvicino CR, Bragagnolo C, Guimarães GD, Almada GL, Machado RR, Lavocat M, Elkhoury MDR, Schrago CG, de Lemos ERS: **Phylogenetic analysis of the S segment from Jujuitiba hantavirus: Identification of two distinct lineages in Oligoryzomys nigripes.** *Infect Genet Evol* 2013, **18**:262–268.
13. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S: **MEGAS: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods.** *Mol Biol Evol* 2011, **28**:2731–2739.
14. Gouy M, Guindon S, Gascuel O: **SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building.** *Mol Biol Evol* 2010, **27**:221–224.
15. Ronquist F, Huelsenbeck JP: **MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models.** *Bioinformatics* 2003, **19**:1572–1574.
16. Posada D: **jModelTest: phylogenetic model averaging.** *Mol Biol Evol* 2008, **25**:1253–1256.
17. Raboni SM, De Borja L, Hoffmann FG, De Noronha L, Azevedo, Marín Luizé Viola Carstensen S, Mazzarotto GACA, Bordignon J, Nunes C: **Evidence of circulation of Laguna Negra-like hantavirus in the Central West of Brazil: Case report.** *J Clin Virol* 2009, **45**:153–156.
18. Firth C, Tokarz R, Smith DB, Nunes MRT, Bhat M, Rosa EST, Medeiros DBA, Palacios G, Vasconcelos PFC, Lipkin WI: **Diversity and distribution of hantaviruses in South America.** *J Virol* 2012, **86**:13756–13766.
19. Johnson AM, Bowen MD, Ksiazek TG, Williams RJ, Bryan RT, Mills JN, Peters CJ, Nichol ST: **Laguna Negra virus associated with HPS in western Paraguay and Bolivia.** *Virology* 1997, **238**:115–127.
20. Labruna MB, Whitworth T, Bouyer DH, McBride J, Camargo LMA, Camargo EP, Popov V, Walker DH: **Rickettsia bellii and Rickettsia amblyommii in Amblyomma ticks from the State of Rondônia, Western Amazon, Brazil.** *J Med Entomol* 2004, **41**:1073–1081.
21. Ogrzewalska M, Uezu A, Labruna MB: **Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the Atlantic Forest in northeastern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks.** *Parasitol Res* 2011, **108**:665–670.
22. Tomassone L, Nuñez P, Ceballos LA, Gürtler RE, Kitron U, Farber M: **Detection of "Candidatus Rickettsia sp. strain Argentina" and Rickettsia bellii in Amblyomma ticks (Acari: Ixodidae) from Northern Argentina.** *Exp Appl Acarol* 2010, **52**:93–100.
23. Labruna MB, Pacheco RC, Nava S, Brandão PE, Richtzenhain LJ, Guglielme AA: **Infection by Rickettsia bellii and Candidatus "Rickettsia amblyommii" in Amblyomma neumanni ticks from Argentina.** *Microb Ecol* 2007, **54**:126–133.
24. Apperson CS, Engber B, Nicholson WL, Mead DG, Engel J, Yabsley MJ, Dail K, Johnson J, Watson DW: **Tick-borne diseases in North Carolina: is "Rickettsia amblyommii" a possible cause of rickettsiosis reported as Rocky Mountain spotted fever?** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008, **8**:597–606.
25. Ogrzewalska M, Literak I, Cardenas-Callirgos JM, Capek M, Labruna MB: **Rickettsia bellii in ticks Amblyomma varium Koch, 1844 from birds in Peru.** *Ticks Tick Borne Dis* 2012, **3**:254–256.
26. Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, Rollin PE, Ksiazek TG, Feldmann H, Sanchez A, Childs J, Zaki S, Peters CJ: **Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness.** *Science* 1993, **262**:914–917.
27. Ferrer JF, Jonsson CB, Esteban E, Galligan D, Basombrio MA, Peralta-Ramos M, Bharadwaj M, Torrez-Martinez N, Callahan J, Segovia A, Hjelle B: **High prevalence of hantavirus infection in Indian communities of the Paraguayan and Argentinean Gran Chaco.** *Am J Trop Med Hyg* 1998, **59**:438–444.
28. Ferrer JF, Galligan D, Esteban E, Rey V, Murua A, Gutierrez S, Gonzalez L, Thakuri M, Feldman L, Poiesz B, Jonsson C: **Hantavirus infection in people inhabiting a highly endemic region of the Gran Chaco territory, Paraguay: association with Trypanosoma cruzi infection, epidemiological features and haematological characteristics.** *Ann Trop Med Parasitol* 2003, **97**:269–280.
29. Chu Y-K, Owen RD, Gonzalez LM, Jonsson CB: **The complex ecology of hantavirus in Paraguay.** *Am J Trop Med Hyg* 2003, **69**:263–268.
30. Souza WM, Machado AM, Figueiredo LT, Boff E: **Serosurvey of hantavirus infection in humans in the border region between Brazil and Argentina.** *Rev Soc Bras Med Trop* 2011, **44**:131–135.
31. Mendes WS, da Silva AA, Neiva RF, Costa NM, Assis MS, Vidigal PM, Leite M, Rosa ES, Medeiros DB, Smith D, Vasconcelos PF: **Serologic survey of hantavirus infection, Brazilian Amazon.** *Emerg Infect Dis* 2010, **16**:889–891.
32. Levis S, Garcia J, Pini N, Calderón G, Ramirez J, Bravo D, St Jeor S, Ripoll C, Bego M, Lozano E, Barquez R, Ksiazek TG, Enria D: **Hantavirus pulmonary syndrome in northwestern Argentina: circulation of Laguna Negra virus associated with Calomys callosus.** *Am J Trop Med Hyg* 2004, **71**:658–663.
33. Travassos Da Rosa ES, Medeiros DBA, Nunes MRT, Smith DB, Pereira ADS, Elkhoury MR, Santos ED, Lavocat M, Marques AA, Via AVG, Kohl VA, Terças ACP, D'Andrea P, Bonvicino CR, Sampaio De Lemos ER, Vasconcelos PFC: **Molecular epidemiology of Laguna Negra virus, Mato Grosso State, Brazil.** *Emerg Infect Dis* 2012, **18**:982–985.

doi:10.1186/1756-3305-7-191

Cite this article as: de Barros Lopes et al.: *Rickettsia bellii*, *Rickettsia amblyommii*, and Laguna Negra hantavirus in an Indian reserve in the Brazilian Amazon. *Parasites & Vectors* 2014 **7**:191.

## 11.2. RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

Mares-Guia MAMM, Rozental T, Guterres A, Ferreira MSF, Botticini RDG, Terra AKC, Marraschi S, Bochner R, Lemos ERS. 2015. Q fever during dengue outbreak in the State of Rio de Janeiro, Brazil– preliminary results. ESCCAR, International congresso on Rickettsia and other intracelular bactéria. Lausanne, Switzerland, p 98.

Mares-Guia MAMM, Rozental T, Moreira N, Barreira JD, Santana A, Lemos ERS. 2013. A serological and molecular study of *Coxiella burnetii* in domestic animals in Rio de Janeiro, Brazil. II Simpósio Avançado de Virologia Hermann Schatzmayr. P26.

## 11.3. APRESENTAÇÃO ORAL EM CONGRESSO

Mares-Guia MAMM. 2013. A serological and molecular study of *Coxiella burnetii* in domestic animals in Rio de Janeiro, Brazil. II Simpósio Avançado de Virologia Hermann Schatzmayr

Mares-Guia MAMM. 2012. Estudo da febre Q em seres humanos, animais domésticos e artrópodes em uma área no município de Itaboraí, Rio de Janeiro. I Simpósio Avançado de Virologia Hermann Schatzmayr.

## 11.4. OUTRAS ATIVIDADES ACADÊMICAS

Mares-Guia, MAMM; Lemos, ERS; Missailidis, S. Capacitação para a elaboração de poster e de apresentação oral para divulgação de resultados de Trabalhos Técnico - Científicos. 2013.

Mares-Guia, MAMM. Febre Q. 2013. (Docente na disciplina Biologia de Agentes Infecciosos II do programa de Pós-graduação *Stricto Sensu*).

Mares-Guia, MAMM; Oliveira, RC; Couto, F. Mesa Redonda Situação Atual no Brasil: Influenza, Hantavirose e Febre Q. 2013. (Docente na disciplina Doenças Virais e Bacterianas DIP do programa de Pós-graduação *Stricto Sensu*).

Mares-Guia, MA. Epidemiologia e controle das doenças infecciosas e parasitárias. 2012. (Docente na disciplina de Epidemiologia e cont. da pós-graduação *Stricto Sensu* em Medicina Tropical).

## 11.5. MENÇÃO HONROSA

2013 - Apresentação de trabalho oral no II Simpósio Hermann Schatzmayr de Virologia, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

## 11.6. COAUTORIA EM CAPÍTULO DE LIVRO

Ogrzewalska M, Rozental T, Afavacho A, **Mares-Guia MAMM**. Rickettsial Infections, Bartonellosis and Coxiellosis. Chapter 12. In: Marcondes CB. Arthropod Borne Diseases. Springer. In press.

**Maria Angélica Monteiro de Mello Mares-Guia**; Namir Santos Moreira ; Monteiro, R. V.; Roque, A. L. R.. Tecnicas de contenção química de pequenos mamíferos silvestres:

princípios éticos e do e do bem-estar animal e do bem-estar animal no campo. In: Elba Regina Sampaio de Lemos, Paulo Sergio D'Andrea. (Org.). Trabalho de campo com animais: procedimentos, riscos e biossegurança. 1ed.Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014, v. 1, p. 95-103.

Barreira, Jairo Dias; **Maria Angélica Monteiro de Mello Mares-Guia** ; Namir Santos Moreira. Procedimento específicos para a coleta de carrapato, pulga, piolho e acaro. In: Elba Regina Sampaio de Lemos, Paulo Sergio D'Andrea. (Org.). Trabalho de campo com animais: procedimentos, riscos e biossegurança. 1ed.Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014, v. 1, p. 137-141.

Barreira, Jairo D.; **Maria Angélica Monteiro de Mello Mares-Guia** ; Namir Santos Moreira. Trabalho de campo: a importância de conhecer a distribuição dos principais ectoparasitas no Brasil. In: Elba Regina Sampaio de Lemos; Paulo Sergio D'Andrea. (Org.). trabalho de campo com animais: procedimentos, riscos e biossegurança. 1ed.Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014, v. 1, p. 79-88.

### **11.7. CO-ORIENTAÇÃO DE MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO**

Aluna: Mariana Barbosa de Souza Vasconcelos. Monografia de Conclusão de Curso de Ciências Biológicas na Universidade Castelo Branco. Vigilância epidemiológica em área de Febre Q no município de Itaboraí, estado do Rio de Janeiro. 2015.



ANEXO 1



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

Rio de Janeiro, 02 de agosto de 2010.

Carta: 039/10

De: CEP/FIOCRUZ

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

Prezadas Senhoras,

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

Atenciosamente

  
Carla Dias Netto  
Secretaria Geral  
CEP/Fiocruz

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



SECRETARIA DE SAÚDE

**TERMO DE COMPROMISSO**

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

Rio de Janeiro, 05 de julho de 2010

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Therezinha Freitas', is written over a horizontal line.

Therezinha Freitas  
Secretária Municipal de Saúde

ANEXO 3

Ficha de Investigação de Síndrome febril				
SUSPEITA CLÍNICA: <input type="checkbox"/> Dengue <input type="checkbox"/> Leptospirose <input type="checkbox"/> Hepatite <input type="checkbox"/> Hantavirose <input type="checkbox"/> Febre Maculosa <input type="checkbox"/> Febre Q <input type="checkbox"/> Bartonelose Unidade de Saúde: Hospital Municipal Desembargador Leal Junior				
<b>Dados da Amostra</b>				
Amostra: 1ª <input type="checkbox"/> 2ª <input type="checkbox"/> _ª <input type="checkbox"/> Data de Coleta: / / Tipo de Amostra (e/ou): <input type="checkbox"/> Soro <input type="checkbox"/> Coágulo <input type="checkbox"/> Sang. EDTA <input type="checkbox"/> Outro				
<b>Dados Pessoais do Paciente</b>				
1) Nome do paciente		2) Ocupação		
3) Data de Nascimento		4) (ou) Idade	5) Sexo	6) Gestante
/ /		<input type="checkbox"/> DIAS <input type="checkbox"/> MESES <input type="checkbox"/> ANOS	<input type="checkbox"/> Feminino <input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/> Ignorado	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Ignorado
8) Município de Residência		9) Tempo de Residência (data)	10) (ou) tempo de Residência	7) Raça / Cor
/ /		/ /	<input type="checkbox"/> DIAS <input type="checkbox"/> MESES <input type="checkbox"/> ANOS	<input type="checkbox"/> Branca <input type="checkbox"/> Parda <input type="checkbox"/> Negra <input type="checkbox"/> Indígena <input type="checkbox"/> Amarela <input type="checkbox"/> Ignorado
12) Logradouro (rua, avenida,...)		13) Número	14) Complemento (apto, casa..)	15) UF
16) Bairro		17) (DDD) Telefone	18) Zona	19) CEP
20) Ponto de referência		21) Nome da Mãe		
<b>Dados Clínicos do Paciente</b>				
22) Data da investigação		23) Data do início dos 1 <sup>os</sup> sintomas		
/ /		/ /		
24) Sinais e sintomas - Marcar com um <input checked="" type="checkbox"/> : S - SIM N - NÃO I - IGNORADO				
<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Febre	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Dor Abdominal	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Manifestações hemorrágicas/sufusão		
<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Cefaléia	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Necrose de extremidades	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Linfadenopatia		
<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Mialgia	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Icterícia	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Estupor/Coma		
<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Hiperemia Conjuntival	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Prostração	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Hepatomegalia/Esplenomegalia		
<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Exantema	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Petéquias	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Convulsão		
<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Pneumonia	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Diarréia	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Oligúria/Anúria		
<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Hemorragia pulmonar	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Náusea/Vômito	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Dor retroorbital		
<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Alterações respiratórias	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Choque/Hipotensão	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Endocardite		
<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Outros: _____				
<b>Dados Epidemiológicos</b>				
Situação/exposição de risco nas últimas duas semanas (14 dias)				
25) Teve contato com animais? Marcar com um <input checked="" type="checkbox"/> : S - SIM N - NÃO I - IGNORADO				
<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Carrapatos	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Pulgas	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Piolhos	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Capivara	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Cão <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Gato
<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Ovinos/Caprinos	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Equinos	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Bovinos	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Outros animais/ectoparasitas: _____	
26) Frequentou ambientes com mata, floresta, rios, cachoeiras, etc : Marcar com um <input checked="" type="checkbox"/> : S - SIM N - NÃO I - IGNORADO - <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/>				
27) Situação de risco ocorrida nos 30 dias que antecederam os primeiros sintomas (contato/ingestão/limpeza):				
Marcar com um <input checked="" type="checkbox"/> : S - SIM N - NÃO I - IGNORADO				
<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Água ou lama de enchente	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Terreno baldio	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Produtos lácteos não pasteurizados		
<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Fossa, caixa de gordura ou esgoto	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Criação de animais	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Contato com material de parto de animais		
<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Rio, córrego, lagoa ou represa	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Lixo/entulho	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Viajou nos últimos 2 meses		
<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Local com sinais de roedores	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Caixa d'água	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Paciente imunocomprometido		
<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Roedores diretamente	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Plantio/lavoura	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Outros: _____		
<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Uso de agulhas não descartáveis	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Ingestão de carne/peixe cru	_____		
<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Transfusão sanguínea	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> legumes /verduras não lavadas	_____		
<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Banho em baía e/ou rio poluído	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> Armazenamento de grãos	_____		
<b>Tratamento e Medicação</b>				
28) Ocorreu Hospitalização	29) Data da Internação	30) Data da Alta	31) Data do Óbito	32) Nome do Hospital
<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Ignorado	/ /	/ /	/ /	
33) Fez uso de Antibiótico	34) Nome do Antibiótico	35) Data de Início	36) Fez uso de Corticoíde	
<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Ignorado		/ /	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Ignorado	

**Dados Laboratoriais**

37) Diagnóstico Laboratorial 38) Data de conclusão de resultado 39) Data de envio de resultado 40) Nome do Hospital/Médico que foi enviado  
 Sim  Não  Ignorado    / /    / /   

41) **SOROLOGIA** - Resultados

FEBRE MACULOSA	FEBRE Q	BARTONELOSE	HANTAVIROSE	DENGUE	LEPTOSPIROSE	HEPATITE A
<input type="checkbox"/> 1ª Amostra <input type="checkbox"/> 2ª Amostra <input type="checkbox"/> outra amostra	<input type="checkbox"/> 1ª Amostra <input type="checkbox"/> 2ª Amostra <input type="checkbox"/> outra amostra	<input type="checkbox"/> 1ª Amostra <input type="checkbox"/> 2ª Amostra <input type="checkbox"/> outra amostra	<input type="checkbox"/> 1ª Amostra <input type="checkbox"/> 2ª Amostra <input type="checkbox"/> outra amostra	<input type="checkbox"/> 1ª Amostra <input type="checkbox"/> 2ª Amostra <input type="checkbox"/> outra amostra	<input type="checkbox"/> 1ª Amostra <input type="checkbox"/> 2ª Amostra <input type="checkbox"/> outra amostra	<input type="checkbox"/> 1ª Amostra <input type="checkbox"/> 2ª Amostra <input type="checkbox"/> outra amostra
Data de coleta / /	Data de coleta / /	Data de coleta / /	Data de coleta / /	Data de coleta / /	Data de coleta / /	Data de coleta / /
<b>IgM (IFA)</b> <input type="checkbox"/> Reagente <input type="checkbox"/> Não reagente <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<b>IgM (IFA)</b> <input type="checkbox"/> Reagente <input type="checkbox"/> Não reagente <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<b>IgM (IFA)</b> <input type="checkbox"/> Reagente <input type="checkbox"/> Não reagente <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<b>IgM (ELISA)</b> <input type="checkbox"/> Reagente <input type="checkbox"/> Não reagente <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<b>IgM (ELISA)</b> <input type="checkbox"/> Reagente <input type="checkbox"/> Não reagente <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<b>IgM (ELISA)</b> <input type="checkbox"/> Reagente <input type="checkbox"/> Não reagente <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<b>IgM (ELISA)</b> <input type="checkbox"/> Reagente <input type="checkbox"/> Não reagente <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado
Títulação 1 : _____	Títulação 1 : _____	Títulação 1 : _____	Cut off _____ Títulação _____	Cut off _____ Títulação _____	Cut off _____ Títulação _____	Cut off _____ Títulação _____
<b>IgG (IFA)</b> <input type="checkbox"/> Reagente <input type="checkbox"/> Não reagente <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<b>IgG (IFA)</b> <input type="checkbox"/> Reagente <input type="checkbox"/> Não reagente <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<b>IgG (IFA)</b> <input type="checkbox"/> Reagente <input type="checkbox"/> Não reagente <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<b>IgG (ELISA)</b> <input type="checkbox"/> Reagente <input type="checkbox"/> Não reagente <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<b>Micro-aglutinação</b> <input type="checkbox"/> Reagente <input type="checkbox"/> Não reagente <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<b>IgG (ELISA)</b> <input type="checkbox"/> Reagente <input type="checkbox"/> Não reagente <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<b>IgG (ELISA)</b> <input type="checkbox"/> Reagente <input type="checkbox"/> Não reagente <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado
Títulação 1 : _____	Títulação 1 : _____	Títulação 1 : _____	Cut off _____ Títulação _____	Títulação 1 : _____	Cut off _____ Títulação _____	Cut off _____ Títulação _____

42) **ANÁLISE MOLECULAR**

FEBRE MACULOSA	FEBRE Q	BARTONELOSE	HANTAVIROSE	DENGUE	LEPTOSPIROSE	HEPATITE A
<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado

43) **HISTOPATOLOGIA**

FEBRE MACULOSA	FEBRE Q	BARTONELOSE	HANTAVIROSE	DENGUE	LEPTOSPIROSE	HEPATITE A
<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado

44) **IMUNOHISTOQUÍMICA**

FEBRE MACULOSA	FEBRE Q	BARTONELOSE	HANTAVIROSE	DENGUE	LEPTOSPIROSE	HEPATITE A
<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Inconclusivo <input type="checkbox"/> Não realizado

**Informações Complementares**

45) Outro Diagnóstico Laboratorial 46) Data de conclusão de resultado 47) Data de envio de resultado 48) Nome do Agravo  
 Sim  Não  Ignorado    / /    / /   

OBSERVAÇÕES ADICIONAIS: \_\_\_\_\_

**Dados do Investigador**

Município / Unidade de Saúde      Nome      Função  
 \_\_\_\_\_      \_\_\_\_\_      \_\_\_\_\_  
 Assinatura: \_\_\_\_\_

Elaboração: Maria Angélica M. M. Mares-Guia, MSc, CRMV/RJ: 9768. Produto gerado no doutorado de Medicina Tropical/IOC

## A Febre Q é uma doença de notificação?

A partir de 2014 se tornou uma doença de notificação obrigatória em legislação sanitária animal, mas há uma exigência no que diz respeito à saúde humana no âmbito da saúde e da segurança na legislação. Devem ser reportadas para o Departamento de Saúde Local ou para o Departamento de Saúde do Estado.

## Como diagnosticar?

- Exames sorológicos com soros pareados (uma coleta durante a primeira semana de doença e outra após 15 dias) por imunofluorescência indireta (IFA) com provas de uma mudança onde quadruplicou o título anticorpos de imunoglobulina G (IgG)-específicas para antígeno de *C. burnetii* de fase II.
  - Detecção de DNA de *C. burnetii* numa amostra clínica através de amplificação de um segmento-alvo específico pela reação em cadeia da polimerase (PCR).
  - Demonstração da *C. burnetii* numa amostra clínica através de imunohistoquímica (IHQ).
  - Isolamento da *C. burnetii* numa amostra clínica através de cultura.
- OBS.: tecidos infectados e hemoculturas de pacientes com febre Q requerem utilização de biossegurança laboratorial de nível 3 para evitar riscos.

# Febre Q

*Coxiella burnetii*

## O que é Febre Q?

A Febre Q é uma doença que acomete os animais e o homem pela infecção pelo organismo *Coxiella burnetii*. Este organismo pertence a um grupo de bactérias conhecido como rickettsias.

## Febre Q nos animais

A infecção foi detectada em vários animais selvagens e domésticos, aves, e em alguns artrópodes, como carrapatos. As espécies mais comumente infectadas são bovinos, ovinos e caprinos, mas mesmo nestas espécies é uma doença incomum. Muitas vezes o organismo não provoca qualquer doença em animais, mas ocasionalmente pode gerar infecções com inflamações na placenta e abortos em bovinos, ovinos e caprinos.



## Febre Q nas pessoas

A Febre Q em humanos é geralmente uma doença auto-limitante e muitas pessoas que se tornam infectadas não apresentam sintomas. Alguns indivíduos que se tornam doentes, tem sintomas geralmente semelhantes a uma gripe ou pneumonia. Em um pequeno número de casos pode haver complicações graves ou desenvolver hepatite.

Material informativo  
produzido pela equipe do  
Lab. de Hantavírus e  
Rickettsioses da FIOCRUZ

Laboratório de Hantavírus e  
Rickettsioses  
Instituto Oswaldo Cruz/IOC  
Fundação Oswaldo Cruz FIOCRUZ  
Tel: +55 21 2562-1712

## Como é a transmissão?

A Infecção geralmente resulta de inalação de esporos resistentes em forma de partículas de pó (aerossóis) de fluidos reprodutivos, fezes ou urina dos animais infectados. Ou também pela ingestão por outros animais de material infectado contaminado. Picadas de carrapatos infectados podem também infectar os animais, mas raramente ao ser humano. Homens e animais podem se contaminar ao beber leite cru de animais infectados. Esta bactéria pode sobreviver no ambiente por longos períodos de tempo, pois é resistente ao calor e a muitos desinfetantes.

## Como podemos fazer a prevenção contra a infecção?

É importante lembrar que as pessoas não precisam ter contato direto com animais infectados para serem expostas. A maioria das pessoas estão expostas a febre Q por inalar poeiras ou aerossóis contaminados com as bactérias da febre Q. Trabalhando com animais inevitavelmente envolve um estreito contato com material contaminado por isso é muito importante boa higiene pessoal. Cuidado com a exposição a carrapatos e verifique o corpo inteiro diariamente.

## Medidas que devem ser utilizadas para prevenção e controle da febre Q:

- Evite poeiras em celeiro ou outros materiais como a palha que podem estar contaminadas com chorume, urina, leite, ou fluidos de parto de animais (por exemplo, sangue, placentas ou fetos abortados).
- Evite o contato direto com os animais, especialmente ovinos, bovinos, caprinos e outros animais, como camelos.
- Evite manusear lã, couros não transformados de animais como ovinos.
- Evite a ingestão de leite cru ou de cabra. Use somente leite pasteurizado e produtos lácteos.
- Evite áreas onde animais como o gado são alojados ou que tenham sido alojadas, tais como celeiros ou estábulos.
- Evite fumar e comer em torno de animais e estábulos.
- Lave a pele ferida imediatamente com sabão e água corrente.
- Como sempre, boas práticas de higiene para diminuir o risco (ou seja, lavagem freqüente da mão, etc...)

## Como é o tratamento?

Enquanto a maioria dos pacientes pode ter uma recuperação total em alguns meses sem qualquer tratamento; 1% - 2% dos casos de febre Q aguda são fatais. Um antibiótico chamado Doxiciclina é o tratamento de escolha para a febre Q aguda e é muito eficaz no tratamento da infecção. Algumas pessoas com febre Q aguda podem desenvolver a forma crônica da doença após um ano ou até 20 anos após a infecção inicial. Infecções crônicas de Febre Q podem evoluir para uma inflamação do revestimento do coração chamada endocardite, que pode ser grave. Aqueles que têm doenças cardíacas pré-existentes tem um risco maior. A Febre Q crônica é muito mais difícil de tratar e pode exigir uma combinação de dois ou mais antibióticos por longo período de tempo.

Não queime cama ou material de aborto sobre uma fogueira, pois pode aumentar o risco de propagação de aerossol, principalmente se estiver ventando.