

Projecto Febre Q - *Coxiella burnetii* (ref^o PTDC/SAU-SAP/115266/2009)

Nome do Projeto:

Febre Q - do diagnóstico à investigação eco-epidemiológica de *Coxiella burnetii* no contexto da infecção humana

Q fever - from diagnosis to eco-epidemiological investigation of *Coxiella burnetii* in the context of human infection

Resumo/Summary:

A febre Q é uma doença humana de distribuição mundial, com crescente interesse na Europa, causada pela bactéria *Coxiella burnetii*. Este é agente zoonótico que infecta vários grupos de animais, incluindo carraças, aves e mamíferos, sendo os ruminantes domésticos os elementos-chave na epidemiologia da doença. Nos animais a bactéria causa infecções crónicas geralmente assintomáticas sendo eliminada, nas fezes, leite e excreções vaginais, sobretudo durante o parto. A infecção humana ocorre por inalação de aerossóis resultantes do contacto directo com animais infectados ou com o ambiente por estes contaminado. Vias alternativas de infecção incluem a ingestão de leite e derivados não pasteurizados ou de água não canalizada. Nos casos sintomáticos a infecção manifesta-se inicialmente como uma doença aguda, em geral não complicada e autolimitada, caracterizável como um síndrome febril isolado ou associado a hepatite e/ou pneumonia. Formas mais severas potencialmente fatais também têm sido descritas mas estão sobretudo associadas a infecção persistente e à evolução da doença para a fase crónica. Contudo, a evolução da febre Q e o prognóstico favorável são multifactoriais dependendo de aspectos intrínsecos ao hospedeiro (genética, estado imunitário), padrão de resistência aos antibióticos das estirpes, do diagnóstico atempado e intervenção terapêutica adequada. Descrita pela primeira vez em meados do século passado, a febre Q tem vindo a manifestar-se ao longo da história em casos isolados ou surtos. Desde 2003 mais de 6 surtos foram registados na Europa, podendo o cenário da doença variar drasticamente de poucas dezenas a várias centenas de casos declarados anualmente, como nos surtos registados recentemente na Holanda (2007-2009). A possibilidade de surtos, a par do potencial uso do agente em bioterrorismo, tem vindo a preocupar as autoridades competentes, mesmo em países que registam baixas taxas de incidência e a chamar a atenção para a necessidade de uma actualização do conhecimento sobre o impacto de *C. burnetii* na Saúde Pública. Em Portugal a febre Q foi descrita em 1948, sendo uma doença de declaração obrigatória desde 1999 (ICD10:A78) mas cujo verdadeiro impacto na Saúde continua por determinar. Esta é uma doença endémica, associada sobretudo à região sul do país e com uma incidência média de 0,10 casos por 100.000 habitantes ano (1999-2007). Apesar da baixa casuística os dados oficiais sofrem de sub-notificação, sendo que os registos do diagnóstico laboratorial realizado no CEVDI/INSA por si só ultrapassam em dobro os casos notificados. Há ainda a considerar o facto da doença nem sempre ser devidamente diagnosticada, pela inespecificidade da apresentação clínica e/ou do contexto epidemiológico comum a outras zoonoses, como foi comprovado pelo inesperado isolamento de *C. burnetii* e outros resultados confirmatórios obtidos no CEVDI em doentes cuja suspeita clínica não incluía febre Q. Ao que foi dito sobre esta entidade nosológica, acrescenta-se ainda o quase total desconhecimento científico ao nível etiológico e epidemiológico. Nesta perspectiva o projecto proposto teve como objectivo estudar a importância de *C. burnetii* em Saúde Pública, centrando-se essencialmente no sul do país, incluindo Lisboa e Vale do Tejo, Alentejo e Algarve, regiões que no total somam mais de 75% dos casos de febre Q declarados em Portugal. Desta feita foi proposto um trabalho de colaboração, integrando esforço de Instituições de Saúde e Hospitais, para recolher e analisar dados epidemiológicos, clínicos e amostras biológicas. Como complemento ao estudo da eco-epidemiologia do agente no contexto da infecção humana foi ainda planeada a análise de carraças, aves e mamíferos doméstico/silvestres e amostras ambientais. Recorrendo a técnicas convencionais, serológicas, detecção molecular e isolamento do agente, mas também a técnicas vanguarda, nomeadamente no campo da genotipagem, este projecto está a permitir: Identificar os casos humanos e caracterizar o contexto epidemiológico e clínico da doença aguda e crónica; Caracterizar a diversidade genética do agente; Criar uma colecção de isolados portugueses de origem humana e animal; Caracterizar o seu padrão de susceptibilidade aos antibióticos; Identificar potenciais elementos-chave na manutenção de *C. burnetii* e na infecção do Homem, como animais domésticos reservatórios, espécies de carraças vectores e vias de infecção. Este estudo representa um trabalho crucial com vista a promover um melhor conhecimento da realidade portuguesa da Febre Q. A actualização da informação em termos eco-epidemiológicos e nosológicos irá permitir às autoridades competentes tomar decisões fundamentadas sobre a necessidade

de implementação de programas de vigilância e definir estratégias para conter potenciais surtos de febre Q. A integração dos resultados obtidos num contexto europeu irá permitir avaliar a evolução da doença.

Q fever is a worldwide human disease with growing interest in Europe, caused by the gamma-proteobacteria *Coxiella burnetii*. This is a zoonotic agent that infects several groups of animals, including ticks, birds and mammals, with domestic ruminants being regarded as the key-elements in disease epidemiology. The animals usually present with asymptomatic chronic infections, shedding bacteria in faeces, milk and vaginal mucous, mainly during birth or an abortion. The primary route of human infection is by inhalation of aerosols resulted either from direct contact with animals or indirectly from contaminated environment. Additional routes of infection are associated to the ingestion of unpasteurized milk or milk-derivatives and unsanitized water. Symptomatic cases initially present with an acute, usually mild self-limited disease, characterized as a febrile illness with or without hepatitis and/or pneumonia. Severe to potential life-threatening forms have also been reported but are especially associated to infection persistence and disease progression to a chronic phase. Yet, Q fever evolution to remission and favourable prognosis is multifactorial and seems to relay on aspects such as the host genetic susceptibility and immunocompetence, strain virulence such as antibiotic resistance, early diagnosis, and adequate therapeutic intervention. First reported in the beginning of 20th century, Q fever is occurring either as isolate cases or outbreaks. Since 2003, more than 6 outbreaks have been documented in Europe and the disease scenario were drastically changed from few dozens to several hundred cases reported annually, as proven by the latest reports of Netherlands outbreaks (2007-2009). The outbreak possibility, along with the bioterrorism potential of *C. burnetii*, is a concern to competent authorities even in countries that usually present a low disease record and has called attention to Q fever problem and to the need of more actualized knowledge on *C. burnetii* Public Health impact. In Portugal, Q fever was recognized in 1948 and listed as an obligatory reported disease in 1999 (ICD10:A78) but *C. burnetii* importance on Public Health is still to be evaluated. The disease is endemic and mainly associated to the Southern regions of the country with an average of 0.10 cases per 100.000 inhabitants and year (1999-2007). However, this low incidence does not accurately reflect the reality of the disease and records of routine laboratory diagnosis performed at CEVDI are by itself at least 2-times higher than official case reports. In addition to sub-notification, the disease also goes unnoticed, due to non-specific clinical presentation and/or common epidemiological context with other zoonoses, as shown by unexpected isolation of *C. burnetii* and other positive confirmatory results obtained at CEVDI from samples of patients with clinical suspicion of tick-borne disease. Moreover, the knowledge on Q fever etiology and eco-epidemiology is also very limited. In this perspective, the proposed research has been drawn to study the Public Health role of *C. burnetii*, especially focusing the Southern Regions of the country, including Lisbon and Tejo Valley, Alentejo and Algarve, that all together account for more than 75% of Q fever cases reported in Portugal. Collaborative work was implemented, integrating efforts from different health services and hospitals, in order to study epidemiological and clinical data and also biological samples. To complement the eco-epidemiological study in the context of human infection, the research was also extended to the analysis of ticks, domestic/wild birds and mammals and environmental samples. Making use of conventional methods, such as IFA, PCR detection and *in vitro* isolation, well as the state-of-the-art techniques of genotyping, this project is contributing to: Identify Q cases and characterize the epidemiological and clinical context of acute and chronic disease; Study agents genetic diversity; Create library of Portuguese *C. burnetii* isolates from human and animal origin; Study the antimicrobial susceptibility these strains; Identify potential key-elements in agent's maintenance and human infection, such as domestic reservoirs, vector ticks species and routes of infection. This study comprises a crucial work towards a better understanding of *C. burnetii* Public Health relevance. It will provide updated information on eco-epidemiology, and disease determinants that will help authorities and other interested stakeholders to make informed decisions about the implementation of surveillance programs and strategies to control potential outbreaks. The integration of the results will contribute to a better understanding of the European situation at a global level.

Coordenador/Investigador Responsável:

Ana Sofia Santos (CEVDI, INSA) ana.santos@insa.min-saude.pt

Equipa de projecto:

Ana Botelho (INIAV)
Ana Paula Proença (HDF)

Baltazar Nunes (DEP, INSA)
Daniela Jones-Dias (LNR-RA, INSA)
Eugénia Ferreira (LNR-RA, INSA)
José Manuel Poças (HSB)
Líbia Maria Marques Zé-Zé (CEVDI, INSA)
Luís Raposo Duarte (CEVDI, INSA)
Maria Dulce Pascoalinho (ULSLA)
Maria José Barahona (INIAV)
Maria Margarida Santos-Silva (CEVDI, INSA)
Maria Sofia Núncio (CEVDI, INSA)
Raquel Tavares (HEM)
Patrick de Oliveira Freire (INIAV)
Rita de Sousa (CEVDI, INSA)
Vera Escoto (ULSNA)

Consultores:

João Lavinha (DGH, INSA)
Manuela Caniça (LNR-RA, INSA)

Parceria Nacionais:

- Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas Dr. Francisco Cambournac, Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge (CEVDI, INSA)
- Departamento de Epidemiologia, Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge (DEP, INSA)
- Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge (DGH, INSA)
- Departamento Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge (DSA, INSA)
- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa
- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
- Hospital Egas Moniz, Centro Hospitalar de Lisboa Central (HEM)
- Hospital São Bernardo, Centro Hospitalar de Setúbal (HSB)
- Hospital Sta Luzia de Elvas, Unidade Local de Saúde do Norte Alentejano (ULSNA)
- Hospital do Espírito Santo de Évora (HES)
- Hospital do Litoral Alentejano, Unidade Local de Saúde do Litoral Alentejano (ULSLA)
- Hospital Distrital Faro, Centro Hospitalar do Algarve (HDF)
- Laboratório Nacional de Referência das Resistências aos Antimicrobianos, Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge (LNR-RA, INSA)
- Instituto Nacional de Investigação Veterinária e Agrária (INIAV)
- Universidade de Évora (EU)

Parceria Internacionais:

- Department of Medical Microbiology and Infectious Diseases, Canisius-Wilhelmina Hospital, Nijmegen, the Netherlands

Financiamento:

Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT)

Duração:

01-04-2011 a 31-12-2014

Objetivos:

- Contribuir para o estudo da bactéria *Coxiella burnetii*, agente da Febre Q;
- Caracterizar a doença aguda e crónica do ponto de vista epidemiológico e clínico;

- Estudar factores de virulência das estirpes que circulam no país (grupos genéticos e perfis de resistência a antimicrobianos de eleição para tratamento da febre Q)
- Acompanhar a situação da febre Q em Portugal e divulgar a importância da *C. burnetii*, quer em termos de medicina humana como veterinária

Indicadores de Realização até ao momento

Publicações

1. Santos AS, Tilburg JJ, Botelho A, Barahona MJ, Nuncio MS, Nabuurs-Franssen MH, Klaassen CH. **Genotypic diversity of clinical *Coxiella burnetii* isolates from Portugal based on MST and MLVA typing.** Int J Med Microbiol 2012;302(6):253-6.
2. Boattini M, Almeida A, Moura RB, Abreu J, Santos AS, Toscano Rico M. **Chronic Q fever with no elevation of inflammatory markers: a case report.** Case Report Med. 2012:249705
3. Cumbassá A, Barahona MJ, Cunha MV, Azórin B, Fonseca C, Rosalino LM, Tilburg J, Hagen F, Santos AS, Botelho A. **Focus on a low-profile pathogen: *Coxiella burnetii* DNA detected in unsuspected domestic ruminants and wildlife.** Veterinary Microbiology (Em submissão, 2015).

Outras publicações de índole científica

1. Santos AS. **Febre Q - Uma realidade com contornos ainda pouco conhecidos em Portugal.** CTA Newsletter 2011; 3:5-7.
<http://evunix.uevora.pt/~fcs/CTANewsletter3.pdf>

Capítulos de livros

1. Santos AS. **“Febre Q”** IN Doenças Transmitidas por Vectores Situação em Portugal, Nuncio MS & Alves MJ (eds), cap IV, April 2014, pp 121- 125.
2. Santos AS. **“Deteção de *Coxiella burnetii* pela reação de polimerase em cadeia em formato touchdown e nested”** IN Abordagens Moleculares em Veterinária, Inácio J & Cunha M (eds), cap 18, pp 245-251.

Apresentações orais

1. Marques C, Duarte A, Leal A, Santos AS, Veloso R, Meireles J, Santos-Silva MM, Tavares L, Pereira da Fonseca I. **Deteção de agentes de DTC em ixodídeos de Portugal.** VII Congresso Hospital de Montenegro, 11-12 Fevereiro 2012, Porto (apresentação por convite).
2. Sousa Ribeiro A, Ribeiro A, Santos AS, Nuncio MS. **Quadro clínico de Insuficiência Renal associado a rabdomiólise devido a Febre Q Aguda.** 17º Congresso Nacional de Medicina Interna, 18 - 21 de Maio 2011, Porto.
3. Santos AS. **Diagnóstico - Pneumonias atípicas - Diagnóstico Laboratorial.** I Jornadas Temáticas de Doenças Infecciosas de Setúbal. Zoonoses e Doenças Transmissíveis por Vectores, 8 e 9 de Fevereiro, 2013, Setúbal (apresentação por convite).
4. Santos AS, Santos-Silva M, Melo P, Duarte L, Fonseca C, De Sousa R. **Rickettsiales em ungulados selvagens e seus ixodídeo.** IV Reunião de Ungulados Silvestres Ibéricos (RUSI), 20- 21 de Setembro, 2013, Barrancos (apresentação por convite).
5. Marques C, Veloso R, Santos, AS, Duarte A, Leal A, Meireles J, Santos-Silva M, Tavares L, Pereira da Fonseca I. **Deteção de *Coxiella burnetii* em ixodídeos colhidos em cães com dono em Portugal.** VI Congresso de Ciências Veterinárias 2014 - 'Praxis e Futuro', 3-5 de Abril, 2014, INIAV, Oeiras.
6. Cumbassá A, Barahona M, Cunha M, Rosalino LM, Fonseca C, Santos AS, Botelho A. **Sources and routes of transmission of Q fever: detection, identification and molecular typing of *Coxiella burnetii* in domestic and wild animals.** I Congresso de Ciências Veterinárias 2014 - 'Praxis e Futuro', 3-5 de Abril, 2014, INIAV, Oeiras.

- Duarte L, Chilovo R, Cumbassá A, Santos-Silva MM, De Sousa R, Nuncio MS, Tilburg JJHC, Botelho A, Santos AS. **O que acrescenta a investigação eco-epidemiológica ao conhecimento da febre Q.** IV Congresso Nacional de Saúde Pública, 2-3 de Outubro, 2014, Lisboa.

Posters

- Santos AS, Sousa R, Baltazar N, Nuncio MS, André E, Costa A, Tintaneiro C, Pais MJ, Branco V, Vieira D, Pinheiro I, Rego F, Magalhães M, Almeida M, Escoto V, Sá J, Brito AP, Proença P, Poças J. **Diagnostic dilemmas of chronic Q fever: Data from Portuguese case.** 6th International Meeting on Rickettsiae and Rickettsial Diseases, 5 - 7 June 2011, Heraklion, Crete, Greece.
- Botelho A, Barahona M, Cunha M, Freire P, Santos AS. **Towards the understanding of *Coxiella burnetii* impact in public health: PCR Diagnostic of Q-fever in animals.** Microbiotec'11, 1 - 3 de Dezembro, 2011, Universidade do Minho, Braga.
- Santos AS, Tilburg JJ, Botelho A, Barahona MJ, Nuncio MS, Nabuurs-Fransen M, Klaassen CH. **Genotyping of Portuguese *Coxiella burnetii* isolates.** 22th European Congress on Clinical Microbiology and Infection Diseases, 31 de Março a 3 de Abril, 2012, Londres. Resumo publicado Clinical Microbiology and Infection 2012; 18 (suppl S3):576.
- Veloso R, Marques C, Santos-Silva MM, de Sousa R, Pereira da Fonseca I, Santos AS. **Agentes transmitidos por Ixodídeos em espaços públicos de Lisboa.** XVI Congresso Português de Parasitologia, 29-30 de Novembro, 2012, Lisboa.
- Lopes de Carvalho I, Santos AS, Santos-Silva M, Chainho L, Nuncio MS, Sousa R and REVIVE workgroup. **Ticks parasitizing humans: Portuguese surveillance program for tick-borne diseases (REVIVE).** XII International Jena Symposium on Tick-Borne Diseases, 21 – 23 Março, 2013, Weimar, Alemanha.
- Costa B, Santos AS, Delfim T, Gouveia C. **Q fever Osteomyelitis – Case Report.** 31st Meeting on the European Society for Paediatric Infectious Diseases. 28 de Maio a 1 Junho, 2013, Milão, Itália.
- Cumbassá A; Barahona MJ; Santos AS; Botelho B. **Q fever: Unveiling *Coxiella burnetii* population structure in animal reservoirs in Portugal.** Microbiotec'13, 6-8 Dezembro, 2013, Aveiro.
- Santos Silva MM, Antunes S, Domingues N, Domingues A, Santos AS. **Vigilância molecular de agentes infecciosos raros em ixodídeos.** VI Congresso de Ciências Veterinárias 2014 – 'Praxis e Futuro', 3-5 de Abril, 2014, INIAV, Oeiras.
- Cumbassá A; Barahona MJ; Santos AS; Botelho A. **Animal reservoir of Q fever: unveiling *Coxiella burnetii* population structure in animal reservoirs in Portugal.** 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID 2014), 10-13 de Maio, 2014, Barcelona, Espanha.
- Morais A, Silva LO, Santos AS, Delfim T, Seves G, Gouveia G. **Q Fever Osteomyelitis: A Rare Diagnosis.** 32nd Meeting on the European Society for Paediatric Infectious Diseases. 6-10 de Maio, 2014, Dublin, Irlanda.
- Domingues N, Antunes S, Santos AS, Santos-Silva MM, Domingos A. **What are Portuguese ticks hiding?** Joint 8th International Ticks & Tick-borne pathogens (TTP8) & Biennial Society for Tropical Veterinary Medicine 8STVM Conference, 24-29 de Agosto, 2014, Cape Town, África do Sul.
- Santos-Silva MM, Domingues N, Melo P, Santos N, Tavares Santos P, Antunes S, Domingos A, Santos AS. **Surveillance for ticks and tick-borne pathogens in field and animal populations sharing Iberian lynx habitat.** VIII International Conference on Tick and Tick-borne Pathogens (TTP-8), 24-29 de Agosto, 2014, Cape Town, África do Sul.
- Santos AS, De Sousa R, Luz T, Parreira P, Gomes S, Nuncio S. **Febre Q: a experiência de dez anos de diagnóstico laboratorial.** IV Congresso Nacional de Saúde Pública, 2-3 de Outubro, 2014, Lisboa.
- Santos AS, Amaro F, Norte AC, Melo P, Santos-Silva MM, Sousa R, Pascoal da Silva L, Alves MJ, Nuncio MS, Hagen F, Tilburg JJHC. **Detection of *Coxiella burnetii* in rodents and wild birds in Portugal.** International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance (IMED 2014), 31 de Outubro – 3 de Novembro, 2014, Vienna, Austria.

15. Santos-Silva MM, Antunes S, Domingues N, Ferrolho J, Raposo Duarte L, Melo P, Santos N, Tavares Santos P, Domingos A, Santos AS. **A pesquisa de agentes zoonóticos em ixodídeos (Ixodida, Ixodidae) no restabelecimento de populações de lince ibérico no Sul de Portugal.** XVII Congresso Português de Parasitologia. 20 – 21 de Novembro, 2014, Coimbra. Resumo na Acta Parasitologia Portuguesa 2014; 20(1/2): 234-235.

Teses

1. Ana Raquel Chilovo Morgado Veloso. Tese de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. **Pesquisa de *Coxiella burnetii* em ixodídeos capturados em parques urbanos de Lisboa.** Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, 2013, 125 pp. Avaliada com 18 valores.
2. Aminata Cumbassá. Tese de Mestrado em Microbiologia Aplicada. **Sources and routes of transmission of Q fever: detection, identification and molecular typing of *Coxiella burnetii* in domestic and wild animals.** Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2013, 42 pp. Avaliada com 17 valores.
3. Luís Filipe Raposo Duarte. Tese de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. **Pesquisa de *Coxiella burnetii* em animais de companhia em contexto urbano.** Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 2014, 89 pp. Avaliada com 18 valores.
4. Jeroen Johannes Hubertina Cornelis Tilburg. Tese de Doutoramento. **Molecular Investigation of the Q fever epidemic in the Netherlands.** Apresentada à Radboud Universiteit Nijmegen, 2013, 194 pp. O projecto contribui parcialmente para a tese.

Prémios

1. Prémio da European Society of Clinical Microbiology and Infection (ESCFI) pela participação “**Genotyping of Portuguese *Coxiella burnetii* isolates**”, 22th European Congress on Clinical Microbiology and Infection Diseases, 31 de Março a 3 de Abril, 2012, Londres.

Áreas de projecto : Investigação & Desenvolvimento

Departamentos: Doenças Infecciosas