

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRARIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

***Coxiella burnetii* em queijos Minas artesanais
comercializados na região Cerrado, Minas Gerais**

**Camila de Fátima Nascimento
Médica Veterinária**

**Jaboticabal
2020**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

***Coxiella burnetii* em queijos Minas artesanais
comercializados na região Cerrado, Minas Gerais**

Discente: Camila de Fátima Nascimento
Orientadora: Profa. Dra. Karina Paes Bürger
Coorientador: Prof. Dr Marcos Rogério André

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Medicina Veterinária
Preventiva

Jaboticabal
2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: *Coxiella burnetii* EM QUEIJOS MINAS ARTESANAIS COMERCIALIZADOS NA REGIÃO CERRADO, MINAS GERAIS

AUTORA: CAMILA DE FÁTIMA NASCIMENTO

ORIENTADORA: KARINA PAES BÜRGER

COORDINADOR: MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Medicina Veterinária Preventiva pela Comissão Examinadora:

Karina Paes Bürger

Profa. Dra. KARINA PAES BÜRGER (Participação Virtual)

Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

p/ Karina Paes Bürger

Profa. Dra. MARIANA ASSUNÇÃO DE SOUZA (Participação Virtual)

Centro Universitário de Patos de Minas-UNIPAM / Patos de Minas/MG

p/ Karina Paes Bürger

Profa. Dra. ADOLORATA APARECIDA BIANCO CARVALHO (Participação Virtual)

Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 18 de dezembro de 2020

N244c

Nascimento, Camila de Fátima

Coxiella burnetii em queijos minas artesanais
comercializados na região Cerrado, Minas Gerais / Camila de
Fátima Nascimento. -- Jaboticabal, 2021

71 p. : tabs., mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,

1. Febre Q. 2. Saúde Pública. 3. Zoonoses. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos
pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Camila de Fátima Nascimento- nascida na cidade de Patos de Minas, Minas Gerais, em 15 de janeiro de 1990. Formada Medicina Veterinária (Bacharelado) pelo Centro Universitário de Patos de Minas-UNIPAM no ano de 2018. Durante a graduação, realizou iniciação científica bolsa PIBIC (Programa de Iniciação Científica) por dois anos como bolsista (2015-2016 e 2016-2017) e um ano como voluntária (2014-2015) com pesquisas nas áreas Doenças Infecciosas, Zoonoses e Saúde Pública sob a orientação da Prof(a). Dr(a). Mariana Assunção de Souza. Ingressou no curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Preventiva FCAV/UNESP em março de 2019 sob orientação da Prof(a). Dr(a). Karina Paes Bürger, com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES).

EPÍGRAFE

“Porque dele, por ele e para ele são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente.

Amém”

Romanos 11:36

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais Antônio D. Nascimento e Maria de Fátima N. Nascimento
pelo carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela dádiva da vida.

Aos meus pais, Antônio D. Nascimento e Maria de Fátima N. Nascimento, pelo companheirismo incentivo, amor e paciência.

Aos meus irmãos Renata de F. Nascimento, Bruno D. Nascimento e Daniela C. Nascimento e meus cunhados Alexandre Santos, Samara G. Nascimento e Marcus V. Pires pela união, incentivo e amor.

Aos meus demais familiares e irmãos em Cristo da Igreja Casa da Benção e Nova Aliança agradeço pelas orações ao longo desta minha jornada.

Às minhas novas amigas Tauara Dias, Dália Machado e Valdinete Benevides pelo carinho e parceria.

À minha orientadora Profa. Dra. Karina Paes Bürger que acreditou em mim desde o começo, minha admiração e agradecimento pela oportunidade concedida de vivenciar a pesquisa científica e por todo o conhecimento compartilhado.

Ao meu coorientador que foi fundamental nesse processo de crescimento Prof. Dr. Marcos Rogério André, e pela confiança a mim depositada e aos demais colegas de laboratório, Victória Valente, Luiz Ricardo Gonçalves, Maria Eduarda Furquim, Amanda Barbosa, Ana Cláudia Calchi, Kayo Neto, Priscila Ikeda, Livia Perles, Renan Amaral, Leidiane Lima, Laryssa Borges, Matheus Santana, Ana Júlia, Ana Carolina, Thiago Merighi, Marielle Santi, Jaqueline Camargo, pelos conhecimentos e momentos compartilhados

Às Professoras Dra. Adolorata Ap. Bianco Carvalho e Dra. Ingrid Bortolin Affonso Lux Hoppe e ao Prof. Dr. Luis Antonio Mathias pela contribuição no decorrer dessa caminhada.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária e ao Prof. Estevam G. Lux Hoppe pela aquisição dos materiais para execução do projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE QUADROS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	1
2.1. Geral.....	1
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3.1. Febre Q.....	2
3.1.1. Histórico.....	2
3.1.2. Agente etiológico.....	2
3.1.3. Fases antigênicas.....	3
3.1.4. Epidemiologia.....	3
3.1.4.1. Fonte de Infecção.....	3
3.1.4.2. Meios de Transmissão.....	6
3.1.5. Patogenia.....	6
3.1.6. Métodos Diagnósticos.....	8
3.1.6.1. Cultura de <i>C. burnetii</i>	8
3.1.6.2. Imunohistoquímica.....	8
3.1.6.3. Sorológicos.....	9
3.1.6.4. Molecular.....	9
3.1.7. Febre Q no mundo.....	9
3.1.8. Febre Q no Brasil.....	11
3.1.9. <i>C. burnetii</i> em produtos lácteos.....	13
3.2. Queijo Minas Artesanal e a produção no Município de Patos de Minas-MG.....	16
3.3. Consumo de produtos lácteos informais.....	17
4. REFERÊNCIAS.....	18

CAPÍTULO 2- Molecular Detection of <i>Coxiella burnetii</i> in Unstandardized Minas	
Artisanal Cheese Marketed in Southeastern Brazil.....	31
Abstract.....	31
1. Introduction.....	33
2. Material and Methods.....	34
2.1. Study área and sample design.....	34
2.2. Sample collection.....	35
2.3. DNA extraction and quality assessment.....	35
2.4. Quantitative real-time PCR (qPCR).....	35
2.5. Amplification of <i>C. burnetii</i> DNA using nested PCR (nPCR).....	36
2.6. DNA purification.....	37
2.7. Sequencing.....	37
2.8. Identification of the profile of consumers of dairy products and statistical analysis.....	37
3. Results.....	38
4. Discussion.....	42
5. Conclusion.....	45
Declaration of competing interest.....	46
Ethics committee.....	46
Acknowledgments.....	46
Refereces.....	46
CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
Referências.....	55
Apêndice A- Roteiro de entrevista para diagnóstico de situação do consumo de produtos lácteos no Município de Patos de Minas-MG.....	57

LISTA DE TABELAS

Table 1. Result of positive samples for <i>C. burnetii</i> using qPCR based on the IS1111 gene.....	38
Table 2: Percentage of identity (BLASTn) of the 16S rRNA sequences of <i>C. burnetii</i> , obtained from unstandardized samples of Minas artisanal cheeses marketed in the Municipality of Patos de Minas, Minas Gerais, with sequences previously deposited in the GenBank.....	39
Table3: Absolute and relative frequencies of the profile of consumers of dairy products interviewed in the municipality of Patos de Minas, Minas Gerais, 2020.....	40
Table 4: Absolute and relative frequencies of respondents' level of consumption of milk and milk products.....	41
Table 5: Variables analyzed using Odds Ratio and Fisher's exact test, based on the responses of respondents in establishments in the Municipality of Patos de Minas, Minas Gerais, 2020.....	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Levantamento de estudos sobre a ocorrência de <i>C.burnetii</i> em várias espécies no Brasil.....	5
Quadro 2. Levantamento de estudos de febre Q no Brasil.....	12
Quadro 3. Levantamento de estudo sobre a detecção de <i>C. burnetii</i> em produtos lácteos no mundo.....	14

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa evidenciando a localização de estudos sobre ocorrência de *Coxiella burnetii* em produtos lácteos no mundo.....15
- Figura 2.** Mapa das sete regiões produtoras do Queijo Minas Artesanal, reconhecidas pelo governo do Estado de Minas Gerais e em destaque, o Município de Patos de Minas localizado na região do Cerrado.....17
- Fonte:** Emater 2015 com adaptações.

Resumo

Coxiella burnetii é o agente etiológico de uma zoonose denominada febre Q. Essa infecção, caracterizada por sinais clínicos agudos e crônicos inespecíficos, é transmitida ao humano, principalmente, por aerossóis de fezes, urina, leite e restos placentários ou consumo de leite e derivados provenientes de animais infectados. Embora passível de ocorrer, a transmissão por produtos lácteos é pouco descrita na literatura. O presente trabalho objetivou investigar a presença de DNA de *C. burnetii* em queijos Minas Artesanais comercializados informalmente em pequenos, médios e grandes mercados no Município de Patos de Minas-Minas Gerais, sudeste do Brasil. Para tal, utilizou-se a técnica de PCR em tempo real quantitativa (qPCR) baseada no gene IS1111. Foram realizadas 150 entrevistas de consumidores de produtos lácteos para análise do perfil. Os resultados mostraram que 4,6% (4/87) das amostras foram positivas para *C. burnetii* na qPCR, com 99,84% de identidade para o gene 16S. Nas entrevistas, foram observados que 95,3% (143/150) dos entrevistados consomem leite e derivados; 50% (75/150) consomem leite e queijo tipo Minas Artesanal fresco pelo menos uma vez ao dia; 62% (93/150) não observam os carimbos de inspeção nas embalagens na hora da compra; e, 81,3% (122/150) não sabem o significado desses carimbos. Dessa forma, a presença de DNA de *C. burnetii* nos queijos analisados e o consumo desse produto comercializado informalmente, ascende um alerta para o risco de transmissão de febre Q na população que consome esse tipo de produto.

Palavras chaves: Febre Q, Saúde Pública, Zoonoses

Abstract

Coxiella burnetii is the etiological agent of a zoonosis called Q fever. This infection characterized by acute and chronic non-specific clinical signs. It is transmitted to humans, mainly by aerosols from feces, urine, milk and placental remains or consumption of milk and derived from infected animals. Although likely to occur, transmission by dairy products is poorly recorded in the literature. The present study aimed to investigate the presence of DNA from *C. burnetii* in cheeses Minas Artisanal marketed informally in small, medium and large markets in the Municipality of Patos de Minas Gerais, southeastern Brazil. To do this, use a quantitative real-time PCR (qPCR) technique that is not based on the IS1111 gene. Were 150 interviews of consumers of dairy products were carried out for profile analysis. The results showed that 4.6% (4/87) of the samples were positive for *C. burnetii* in qPCR, with 99.84% of identity for the 16S rRNA gene. In the interviews, 95.3% (143/150) of the interviewees consumed milk and dairy products were observed; 50% (75/150) consumption cheeses Mins Artisanal Minas in nature milk at least once a day; 62% (93/150) did not observe the inspection stamps on the packaging at the time of purchase; and 81.3% (122/150) do not know the meaning of these stamps. Thus, the presence of *C. burnetii* DNA in the analyzed products and the consumption of this product sold informally, raises an alert for the risk of transmission of Q fever in the population that consumes this type of product.

Keywords: Fever Q, Public Health, zoonoses

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

As zoonoses, doenças naturalmente transmissíveis entre humanos e animais, correspondem aos maiores índices de ocorrência de agravo à Saúde Pública registrada no Brasil.

A febre Q, causada pela *Coxiella burnetii*, se destaca nesse contexto, pois os animais domésticos estão ligados a cadeia epidemiológica na transmissão desta zoonose ao humano, principalmente por inalação de aerossóis contaminados com restos placentários, fezes, urina e leite de animais infectados e pelo consumo de leite e de produtos lácteos.

Essa infecção não é de notificação obrigatória no Brasil, e possui inespecificidade de manifestações clínicas que vão desde um estado febril limitado até agravos como pneumonia, hepatite, endocardite e meningoencefalite, o que torna a enfermidade de difícil diagnóstico e negligenciada no País.

O consumo de queijo Minas Artesanal, faz parte da história e da cultura do estado de Minas Gerais. Esses queijos são produzidos com leite *in natura* e como essa matéria prima é uma via de eliminação de *C. burnetii* por animais infectados se torna uma preocupação para a saúde dos consumidores desse produto.

O consumo de produtos lácteos vendidos informalmente é outro agravante na transmissão de zoonoses para os humanos, visto que não se sabe a qualidade microbiológica e nem a procedência desses alimentos.

No Brasil, são escassos os estudos sobre esse agente em produtos lácteos e sua implicação em Saúde Pública, por isso, necessita-se investigar se *C. burnetii* está presente nos produtos lácteos artesanais comercializados informalmente no Município de Patos de Minas, Minas Gerais.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Identificar a presença de *C. burnetii* em Queijo Minas Artesanal e estabelecer o perfil dos consumidores na região do Cerrado MG.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Febre Q

3.1.1 Histórico

A febre Q foi descrita inicialmente na Austrália em 1935, quando Edward Holbrook Derrick foi convidado a investigar uma doença em um grupo de trabalhadores de um matadouro. Por desconhecer a doença, passou a denominá-la febre Q (*Query Fever*). Em 1937, os pesquisadores Frank Macfarlane Burnet e Mavis Freeman denominaram o microrganismo causador da doença de *Rickettsia burnetii*, devido às suas características similares aos agentes do gênero *Rickettsia* (Costa et al., 2006; Santos et al., 2007; Oyston e Davies, 2011).

Enquanto isso em Montana, nos Estados Unidos, um grupo de pesquisadores liderados por Herald R. Cox, também desenvolvia trabalhos com um microrganismo desconhecido (inicialmente chamado agente Nine Mile). Somente mais tarde foi possível perceber que se tratava do mesmo microrganismo estudado por Burnet e Freeman. Em 1948, após identificação molecular, a bactéria foi descrita como pertencente ao gênero *Coxiella* e nomeada, *Coxiella burnetii*, em homenagem aos pesquisadores Macfarlane Burnet, de Brisbane, e Herald Cox, de Montana (Maurin e Raoult, 1999).

3.1.2. Agente etiológico

Coxiella burnetii é o agente etiológico dessa zoonose, o gênero *Coxiella* pertence à ordem *Legionellales*, família *Coxiellaceae* da classe das gamma-proteobactérias (Seshadri et al., 2003).

C. burnetii é uma bactéria Gram-negativa intracelular pequena, obrigatória e pleomórfica (0,2-0,4 µm de largura, 0,4-1,0 µm de comprimento). Apesar da estrutura da membrana celular típica de uma bactéria Gram-negativa, a coloração por método Gimenez é o mais indicado para esse agente (Gimenez, 1964).

Esse agente possui duas variações celulares, uma forma pequena conhecida como “Small Cell Variant” (SCV) que possui cromatina condensada, cápsula espessa, além de um sistema de membranas internas incomum e mostra-se metabolicamente inativa. SCVs apresentam alta resistência osmótica, química, mecânica, ao aquecimento e ao estresse por dessecação. Essas propriedades

levaram à adoção de uma alta temperatura (71,7°C) para pasteurização do leite na década de 1950 (Enright et al., 1957). Eldin et al, (2017) concluíram que o agente pode sobreviver no solo por longos períodos e ser transportado pelo vento por distâncias de até 30 km. E a outra variação celular, “Large Cell Variant” (LCV) é uma célula larga menos eletrondensa e é a forma intracelular metabolicamente ativa de *C. burnetii*. (Coleman et al., 2004; Angelakis e Raoul, 2010).

C. burnetii possui elevado poder infectante, acredita-se que 1 a 10 células microbianas sejam suficientes para desencadear a infecção. Por esse motivo, Center for Disease Control and Prevention (CDC) classificou esse microrganismo na categoria B - microrganismos com potencial uso como arma biológica (CDC, 2016).

3.1.3. Fases antigênicas

C. burnetii apresenta uma variação antigênica semelhante a variação liso-rugosa da família *Enterobacteriaceae*. Os lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular das bactérias Gram-negativas são responsáveis por essa variação de fase antigênica de fase I e II. A fase I possui uma sequência completa de LPS de variação lisa, enquanto na fase II o microrganismo apresenta modificações do antígeno da parede celular com variação do LPS rugosa (Maurin e Raoult 1999, Angelakis e Raoult 2010).

A presença de anticorpos anti-*C. burnetii* fase I está associada a cronicidade da infecção, enquanto produção de anticorpos anti-*C. burnetii* em fase II é predominante. Essa alteração antigênica é importante para o seguimento da infecção e seu diagnóstico sorológico (Maurin e Raoult, 1999; Santos et al., 2007; Borriello e Galiero, 2012).

3.1.4. Epidemiologia

3.1.4.1. Fonte de infecção

C. burnetii é uma bactéria com baixa especificidade e pode parasitar uma variedade de hospedeiros vertebrados e invertebrados, como os mamíferos, aves e artrópodes (Raoult e Marrie, 2005).

Os ruminantes domésticos atuam como a principal fonte de infecção do agente da febre Q aos humanos, embora animais de estimação, incluindo gatos,

coelhos e cães, têm sido identificados como potenciais fontes de surtos urbanos (Angelakis e Raoult, 2010).

Os artrópodes exercem papel fundamental para a permanência do patógeno no ambiente, uma vez que atuam como principais vetores através da hematofagia, participam como meio transmissão tanto para os animais domésticos como para os selvagens (Maurin e Raoult, 1999; Angelakis e Raoult, 2010).

Os animais selvagens como os cervídeos e morcegos, atuam como reservatórios da infecção aos animais domésticos, por meio da liberação de *C. burnetii* nas fezes, urina, placenta e leite no ambiente ou pela picada de artrópodes (Palmer et al., 1983; Kazar, 2005).

No Brasil, o referido agente foi relatado em bovinos (Zanato et al., 2019b; Ramos et al., 2020), pequenos ruminantes (Guimarães et al., 2017; Souza et al., 2018; Oliveira et al., 2018), cervídeos (Zanatto et al., 2019a), morcegos (Ferreira et al., 2018), roedores (Rozental et al., 2017), animais de estimação (Mares-Guia et al., 2018; Oliveira et al., 2020) e em outros animais que foram descritos no Quadro 1.

Quadro 1: Levantamento de estudos sobre a ocorrência de *C.burnetii* em várias espécies no Brasil

Referência	Estado	Animal	Amostra	Método (<i>gene</i>)	Prevalência PCR	Soroprevalência
Riemann et al. (1974)	MG	156 bovinos	Sangue	RIFI		29% (45/156)
Widmer et al. (2011)	MS	10 jaguar (<i>panthera onca</i>)	Sangue	RIFI		30% (3/10)
Mares-Guia et al. (2014)	RJ	14 cães, 1 gato, 10 cabras, 3 ovelhas, 2 cavalos	Sangue, leite, swab vaginal/anal	RIFI/PCR(<i>htpAB</i>)	14,2%(2/14) cães, 60%(6/10) cabras	14,2%(2/14) cães, 50%(5/10) cabras
Guimarães et al. (2017)	PI	202 cabras e 153 ovelhas	Sangue	RIFI		2%(3/153) ovelhas
Rozental et al. (2017)	RJ	131 roedores (18 espécies)	Tecido	cPCR (<i>IS1111</i>)	4,6% (6/131) em 4 espécies diferentes	
Ferreira et al. (2018)	RJ, BA e SC	119 morcegos	Baço, fígado e coração	cPCR (<i>IS1111</i>)	3,4% (4/119)	
Souza et al. (2018)	PE	412 cabras e 403 ovelhas	Sangue	RIFI		2,2%(9/412) cabras e 2,1%(9/403) ovelhas
Oliveira et al. (2018)	AL	312 cabras	Sangue, placentas	ELISA/nPCR(<i>IS1111</i>)	8,7% (2/23) placentas	55,1% (172/312)
Mares-Guia et al. (2018)	RJ	68 animais domésticos (cabras, ovelhas, cães e gatos), 74 roedores e 180 carrapatos	Sangue, leite, swab anal e baço	nPCR(<i>IS1111</i>)	14,7% (10/68)1 cabra, 6 ovelhas, 2 cães, 1 gato e 5,5% (2/180) carrapatos	
Zanatto et al. (2019a)	MS, SP, GO, PR	357 cervídeos	Sangue	RIFI/nPCR(<i>htbAB</i>)	0	5,32% (9/169)
Zanatto et al. (2019b)	SP, MG, MS e GO	102 bovinos	Sangue	RIFI		13,7% (128/131)
Mioni et al. (2019b)	SP	3 bovinos, 1 caprino e 3 ovinos	Fetos, swab vaginal	qPCR (<i>IS1111</i>)	Todos positivos	
Oliveira et al. (2020)	CE e PE	51 roedores, 18 marsupiais, 1 canídeo selvagem, 147 cães domésticos	Sangue	RIFI		0-5% (2/217) 1 roedor e 1 marsupial
Ramos et al. (2020)	MT	200 bovinos adultos 200 bezerras (corte)	Sangue	RIFI		1% (2/200) bovinos adultos

3.1.4.2. Meio de transmissão

O principal meio de transmissão de *C. burnetii* para os humanos é por inalação de aerossóis contaminados com placenta, fezes, urina e leite de animais infectados. Estudos relatam que a ocorrência dessa zoonose em humanos, está associada, principalmente a exposição ocupacional nos rebanhos (Costa et al., 2005; Esraso- Cadena et al., 2018).

O consumo de leite cru e derivados contaminados com *C. burnetii*, é considerado outro meio de transmissão, uma vez que essa bactéria tem tropismo por células do útero e glândulas mamárias dos animais (Babudieri, 1959; Maurin e Raoult, 1999; Bouvery et al., 2003). Apesar de evidências experimentais se contradizerem quanto a viabilidade de *C. burnetii* no leite e produtos lácteos contaminados (Hirai et al., 2012; Capuano et al., 2012; Eldin et al., 2013; Barandika et al., 2019), surtos de febre Q foram relatados e a causa mais provável foi o consumo de leite cru (Fishbein e Raoult, 1992; Sings et al., 2012).

Os carrapatos transmitem *C. burnetii* aos animais domésticos e silvestres, mas não para humanos (Kazar, 1996). No entanto, devido a multiplicação nas células intestinais, uma grande quantidade de *C. burnetii* são eliminadas nas fezes dos carrapatos que contaminam couros e lã dos animais parasitados por eles, e tornar um meio de transmissão para as pessoas ao serem inalado como partículas de poeira no ar (Angelakis e Raoult, 2010).

A transmissão de pessoa para pessoa e sexual são muito raras de acontecer e pouco descrita na literatura (Maurin & Raoult 1999; Angelakis & Raoult 2010).

3.1.5. Patogenia

Febre Q é uma enfermidade que pode apresentar forma aguda ou evoluir para a forma crônica. A infecção ocorre após inalação de esporos dispersos no ar ou pela ingestão de leite e produtos lácteos contaminados com *C. burnetii*. Ao penetrar no organismo, a variação celular SCV é fagocitada por macrófagos e monócitos e incita a formação do vacúolo portador da *Coxiella* (CCV), que faz a acidificação do endossoma e diferenciação celular em LCV. Após a fusão do endossoma com o lisossomo e a acidificação do meio, a LCV se multiplica por fissão binária e promove a maturação do CCV, com posterior formação de SCVs, as quais

são liberadas para o meio extracelular e parasitam outros tipos de células do hospedeiros (Howe e Mallavia, 2000; Van Schaik et al., 2013).

Na maioria dos casos, a infecção por *C. burnetii* permanece assintomática ou se apresenta como uma doença inespecífica como febre alta (39 a 40°C), dores de cabeça, mal-estar, fraqueza, arrepios, anorexia, e mais raramente, erupções cutâneas, diarreia, vômito, pericardite, miocardite, meningoencefalite e outras manifestações neurológicas (Clark et al., 1951; Raoult et al., 2000), assim, a infecção permanece sem o devido diagnóstico (Dupuis et al., 1987).

Alguns fatores influenciam na apresentação de sintomatologia clínica. A infecção causada por inalação de aerossóis de fezes, urina, placenta resultante de parto e aborto contaminados pelo patógeno, normalmente apresentam problemas respiratórios como a pneumonia. A hepatite está mais associada a infecção por via digestiva por consumo de leite cru e derivados contaminados com a bactéria. Porém, qualquer que seja a via de infecção de *C. burnetii*, a disseminação hematogênica do patógeno pode levar ao envolvimento de outros órgãos, incluindo baço, medula óssea e trato genital feminino. Outros fatores que interferem na sintomatologia são: a carga bacteriana inalada ou digerida pelo indivíduo, as características do patógeno, que pode variar inclusive de genótipos entre regiões e o estado imunológico do paciente infectado (Maurin e Raoult, 1999).

A febre Q crônica ocorre em aproximadamente 1% até 5% dos pacientes infectados com *C. burnetii* (sintomáticos ou não) e pode se desenvolver meses ou anos após a doença aguda (Maurin e Raoult, 1999; Tissot-Dupont e Raoult, 2008). A endocardite é a forma mais grave e frequentemente fatal da febre Q crônica que acomete, principalmente pacientes com doença valvar prévia ou que são imunocomprometidos (Fenollar et al., 2006). Outras condições do indivíduo como câncer, gravidez ou cirrose, se mostraram fatores predisponentes à infecção. A partir disso, ao adquirir a forma crônica, o paciente pode apresentar além da endocardite, aneurismas e osteomielite (Ortolá et al., 1992; Raoult et al., 2000).

Síndrome de fadiga crônica tem sido relatada como possível manifestação clínica após febre Q aguda. Essa síndrome está associada à desregulação de citocinas e pode apresentar sintomas como fadiga, mialgia, artralgia, suores

noturnos, humor alterações e distúrbios do sono (Marmion et al., 1996; Hatchette et al., 2003).

Em mulheres grávidas, a infecção por *C. burnetii* causa principalmente, aborto nos três primeiros meses de gestação. No entanto, um estudo demonstrou que a febre Q, quando contraída durante a gravidez, pode resultar além de abortos ou mortes neonatais (9 casos, 38%), prematuridade nascimentos e baixo peso ao nascer (8 casos, 33%) (Raoult et al., 2002).

Coxielose é considerado o nome mais apropriado da doença nos animais (Lang, 1988). A maioria dos animais permanecem assintomáticos. A infecção por *C. burnetii* frequentemente se torna crônica e esses animais infectados se tornam portadores do patógeno. Células uterinas e glândulas mamárias são os principais locais de infecção crônica por *C. burnetii* ocasionando alterações reprodutivas, tais como: infertilidade, abortamento, natimortatidade, metrite e mastite, além da eliminação persistente de bactérias no meio ambiente que ocorre principalmente, durante o parto (To et al., 1998; Tissot-Dupont e Raoult, 2008; Ruiz-Fons et al., 2010; Radinović et al., 2012).

3.1.6. Métodos diagnósticos

3.1.6.1. Cultura de *C. burnetii*

A cultura pode ser realizada, porém em laboratórios de nível de biossegurança 3 (BSL3) e por profissionais altamente qualificados. O isolamento de *C. burnetii* a partir de amostras biológicas é realizado nas células embrionárias pulmonares usando a técnica de Marrero e Raoult (1989) por um período de 5 a 7 dias (Angelakis e Raoult, 2010). A coloração com Gimenez ou imunofluorescência é usado para detecção da bactéria dentro das células (Eldin et al., 2017).

3.1.6.2. Imunohistoquímica

A detecção de *C. burnetii* nos tecidos é especialmente informativo em pacientes em tratamento por febre Q crônica. As amostras podem ser testadas frescas ou após fixação de formalina e incorporação de parafina. A imunodetecção é realizada utilizando técnicas de imunoperoxidase ou imunofluorescência com anticorpos policlonais ou monoclonais (Maurin e Raoult, 1999).

3.1.6.3. Sorológicos

O ensaio de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é o método referência para diagnóstico da infecção, mas também podem ser utilizados os teste de fixação de complemento (CFT) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) (Angelakis et al., 2010; Eldin et al., 2017). A resposta imune induz a produção de anticorpos anti-fase II e anti-fase I. Anticorpos de fase I estão associados a cronicidade da infecção, enquanto os anticorpos de fase II são detectáveis de sete a 15 dias após inícios dos sintomas (Anderson et al., 2013; Eldin et al., 2017). Níveis elevados de Imunoglobulina G (IgG) ($> 1/200$) e Imunoglobulina M (IgM) ($> 1/25$) para anticorpos de fase II indicam uma infecção recente. Altos títulos de IgG ($1/800$) e/ou Imunoglobulina A (IgA) ($> 1/50$) para o antígeno da fase I são encontrados em infecções crônicas (Eldin et al., 2017).

3.1.6.4. Molecular

Vários protocolos utilizam a PCR (polymerase chain reaction) para a detecção de material genético de *C. burnetii* nas amostras analisadas. Existem várias técnicas de PCR como a convencional (cPCR), nested (nPCR) ou real time PCR (qPCR). Os ensaios são baseados em regiões gênicas como os utilização de plasmídeos, regiões intergênica como 16S-23S RNA e sequencias repetitivas na região IS1111. Atualmente, a real time PCR (qPCR) é o método mais utilizado para detectar *C. burnetii*, pois é um método com alta sensibilidade e que permite a quantificação de cópias de DNA nas amostras analisadas (Klee et al., 2006).

3.1.7. Febre Q no mundo

A presença de *C. burnetii* tem sido descrita mundialmente, com exceção da Nova Zelândia (Maurin e Raoult, 1999; Eldin et al., 2017) e estudos epidemiológicos indicam que a febre Q é problema de saúde pública em muitos países (Angelakis e Raoult, 2010).

Na Europa, entre 2007 e 2010, o maior surto de febre Q já descrito na literatura ocorreu na Holanda, esse surto afetou 4.026 pessoas nesse período, sendo a incidência máxima em 2008 de 2354 indivíduos, porém não se sabem o

principio desses surtos (Speelman, 2010; Georgiev et al., 2013; Pérez-Arellano et al., 2018).

Na Espanha desde 1980, tem sido relatados surtos em várias cidades do país. Em Madri, Téllez et al. (1989), realizaram um estudo em moradores de áreas urbanas e rurais e detectaram uma prevalência de 8,8% (8/91) e 15,4% (20/130) respectivamente. Outro estudo na cidade de Zaragoza em 480 estudantes de Veterinária, em 2000, detectou uma prevalência de 10,02% de alunos no começo do curso e 11,02% no final (Valencia et al., 2000). Em Barcelona, um estudo com 216 pessoas detectou 15% de sorotipos para febre Q em 2006 (Cardeñosa et al., 2006). Em 2015, outro estudo detectou 14,5% de sororeagentes positivos para febre Q em 634 pacientes hospitalizados na cidade de Burgos (González-Quijada et al., 2015).

Na França, estudos realizados entre 1982 e 2010 mostram uma soroprevalência entre 1% (doadores de sangue) e 71% em pessoas pertencentes a grupos de risco. Nesse mesmo período, foram descritas sete surtos que incluíram de 5 a 289 pessoas, localizados no sudeste do país (Provença, Alpes e Ródano) (Georgiev et al., 2013).

No Quênia, país do continente africano, estudos de soroprevalência em humanos revelaram evidências de infecções por *C. burnetii* variando de 3 a 35,8% em todas as regiões do país nas quais foram realizadas as pesquisas e dois episódios de surto de febre Q foram relatados (Njeru et al., 2016).

No continente Asiático, um surto em uma escola em Israel em 28 de junho de 2005, foram notificados numerosos casos de doença febril entre 322 estudantes e ao realizarem testes sorológicos em 164 pessoas deste surto detectaram 88% (144/164) de sororeativos para *C. burnetii* (Amitai et al., 2010).

Na América do Norte a ocorrência de febre Q é de notificação obrigatória nos Estados Unidos, desde 1999. Um estudo no país no período de 2000 a 2012, relatou que de 314 casos de febre Q (66%) observou exposição a qualquer animal e 185 casos relatados (39%) tiveram exposição a bovinos (25%), cabras (20%), ovinos (17%), cães (21%) e gatos (22%). Dos casos relatados 101 (22%) tiveram exposição a animais recém nascidos e 38 casos (8,4%) relataram consumo de leite não pasteurizado. A prevalência relatada de consumo de leite cru entre os trabalhadores de laticínios (53%) foi significativamente maior do que os que não trabalham

(Dahlgren et al., 2015). Só em 2017, foram notificados 153 casos de febre Q aguda e 40 casos de febre Q crônica nos Estados Unidos (CDC, 2017).

Na América do Sul, vários países relataram casos de febre Q, inclusive alguns que fazem divisa de território com o Brasil. Na Guiana Francesa, um estudo de 2004 a 2007 foram testados por método sorológico (IFA) amostras de 131 pacientes hospitalizados que apresentavam pneumonia, e 24,4% (32/131) foram sororeativos para anti-*C. burnetii* (Epelboin et al., 2012).

Na Argentina, em 2014, 99 moradores de Buenos Aires, participaram de um estudo para detecção de presença de anticorpos anti-*C. burnetii* e outras Rickettsioses. Nesse estudo uma pessoa foi sororreagente e em seu histórico foi descrito a convivência com animais de estimação e presença de carrapatos nesses animais (Cicuttin et al., 2015).

Em um estudo transversal em 48 fazendas da Colômbia, de 2014 a 2015, foram testadas 332 pessoas e 384 bovinos por método sorológico. A maioria das pessoas que participaram desse estudo residiam em área rural e trabalhavam na fazenda. A prevalência de sororreagentes para anti-*C. burnetii* foi de 31,9% (106/332) e 27,1% (104/384) para humanos e bovinos, respectivamente (Eraso-Cadena et al., 2018).

3.1.8. Febre Q no Brasil

No Brasil a notificação de casos de febre Q em humanos não é compulsória. Em 2013, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) introduziu essa infecção como de notificação obrigatória nos animais (Brasil, 2013).

Não se sabe a real situação de casos de febre Q em humanos no País, alguns estudos relataram a ocorrência da infecção em São Paulo (Brandão et al., 1953; Valle et al., 1955; Siciliano et al., 2015), Rio de Janeiro (Lamas et al., 2009, 2013; Lemos et al., 2011, 2018; Rozental et al., 2012, 2018; Mares-Guia et al., 2016), Minas Gerais (Riemann, et al., 1974; Costa et al., 2005; Costa et al., 2006) e Bahia (Siciliano et al., 2008). No Quadro 2 estão elencados estudos de ocorrência de febre Q em humanos no Brasil.

Quadro 2: Levantamento de estudos de febre Q no Brasil

Localidade	Referências	Método	População	Prevalência	Observações
São Paulo	Brandão et al. (1953)	RIFI	473 operários de frigorífico e 170 funcionários de fábrica de vidro	1,6% (8/473) e 1,17% (2/170)	Primeiro relato no Brasil
	Valle et al. (1955)	RIFI	71 tratadores de bovinos	7% (5/71)	
	Ribeiro-Netto et al (1964)	RIFI	200 ordenhadores	8,5% (17/200)	
	Siciliano et al. (2015)	RIFI	221 pacientes Instituto do Coração	1,8% (4/221)	
Minas Gerais	Riemann et al. (1974)	RIFI	144 func. De abatedouro	29% (20/144)	
	Riemann et al. (1975)	RIFI	219 estudantes de Medicina Veterinária	22% (48/219)	
	Costa et al. (2005)	RIFI	437 pessoas saudáveis	3,8% (17/437)	
	Costa et al. (2006)	RIFI	726 pacientes febris	2% (15/726)	
Bahia	Siciliano et al. (2008)	RIFI	1 paciente com endocardite grave e veio a óbito	(Titulação >1/1.600 fase I)	Histórico de trabalho com gado e consumo de leite cru
Rio de Janeiro	Lamas et al. (2009)	RIFI	125 HIV positivos	3,2% (4/125)	Todas grávidas com histórico de abortos
	Lemos et al. (2011)	RIFI/PCR	1 paciente com endocardite	Positivo para <i>C. burnetii</i>	A esposa, dois dos 13 cães sororreagentes para <i>C. burnetii</i>
	Rozental et al. (2012)	PCR	1 paciente pneumonia, febre, tosse, mialgia	Positivo para <i>C. burnetii</i>	Amostra analisada: lavado broncoalveolar
	Lamas et al. (2013)	PCR	51 pacientes operados com endocardites	1 positivo para <i>C. burnetii</i>	Amostras analisadas: válvulas cardíacas provenientes dos pacientes operados
	Mares-Guia et al. (2016)	PCR	272 casos suspeitos de dengue	3,3% (9/272) <i>C. burnetii</i>	
	Lemos et al. (2018)	PCR	47 Cadetes em um surto de febre Q	10,6% (5/47)	
	Rozental et al. (2018)	RIFI	300 pessoas usuários de drogas injetáveis	9,3% (28/300)	
	Mares-Guia et al. (2018)	PCR	24 pacientes com suspeita de febre Q	8,3% (2/24)	

RIFI: reação de imunofluorescência indireta PCR: reação em cadeia polimerase

3.1.9.C. *burnetii* em produtos lácteos

Evidências epidemiológicas associaram surtos de febre Q com o consumo de produtos lácteos não pasteurizados. Nos Estados Unidos, em 2011, Sings et al. (2012) relataram um grupo de 5 pessoas que consumiam leite cru do mesmo laticínio em Michigan. Os resultados sorológicos e clínicos indicavam infecção por *C. burnetii*. Em outro surto de febre Q, em um centro de detenção para meninos em Staffordshire em abril de 1967, acredita-se que o consumo de leite cru foi a causa (Brown et al., 1968).

Fishbein e Raoult (1992) relataram um surto de febre Q entre pacientes e funcionários de uma instituição psiquiátrica na França. Alguns pacientes e funcionários deixavam a instituição diariamente para trabalhar em uma fazenda em que cabras eram criadas para a produção de queijo feito com leite cru. As taxas de infecção eram maiores entre as pessoas que produziam e consumiam esses queijos.

Maltezou et al. (2004) investigaram a incidência da febre Q entre 1.200 crianças hospitalizadas na Grécia e oito (0,67%) pacientes que foram diagnosticadas em fase aguda dessa infecção. A análise multivariada mostrou que as crianças que relataram consumo de queijo artesanal apresentaram maiores chances para essa doença

Apesar dessas evidências a relação entre febre Q e consumo de lácteos não pasteurizados ainda não está totalmente comprovada (EFSA, 2010), e vários estudos que detectaram a presença de DNA nos produtos lácteos se contradizem quanto a viabilidade de *C. burnetii* nesses produtos. O Quadro 3 e a Figura 1 demonstram os estudos realizados em produtos lácteos no mundo. No Brasil, existem apenas dois trabalhos em produtos lácteos, evidenciando a circulação desse patógeno em leite não pasteurizado e em queijo Minas Artesanal fabricados com leite *in natura* (Mioni et al., 2019a; Rozental et al., 2020).

Quadro 3: Levantamento de estudos sobre a ocorrência de *C. burnetii* em produtos lácteos no mundo

Referência	País	Amostras	Método (<i>gene</i>)	Prevalência	Viabilidade
Barbudieri e Muscovici (1950)	África do Sul	Queijo de vaca e ovelha	contaminação experimental	positivos	17 dias em queijo de vaca
Kim et al., (2005)	Estados Unidos	316 de leite bovino	nPCR (<i>IS1111</i>)	94%	
Rodolakis et al., (2007)	França	90 de leite de bovinos	cPCR	38,90%	
Frietz et al., (2007)	Suíça	27 de leite bovinos	nPCR (<i>com 1</i>)	27,60%	
Rahimi et al., (2009)	Irã	210 de leite bovino	nPCR (<i>com 1</i>)	17,90%	
Czaplicki et al., (2009)	Bélgica	150 de leite bovino	qPCR (<i>IS1111</i>)	30%	
Loftis et al., (2010)	Estados Unidos	21 de leite (14 bovinos e 7 cabras)	qPCR (<i>IS1111</i>)	42,9% (1/7) e (8/14)	2 amostras viáveis de <i>C. burnetii</i>
Hirai et al., (2012)	Japão	147 queijos de leite bovino	nPCR (<i>com 1, htpB e icd</i>)	19,00%	Nenhuma célula <i>C. burnetii</i> viável
Capuano et al., (2012)	Itália	169 queijos (bovino, cabra/ovelha e búfala)	qPCR (<i>IS1111</i>)	21,3% geral - 39% bovino 26%cabras/ovelhas 6,9% búfala	
Eldin et al., (2013)	França	201 produtos (178 queijos 10 iogurtes 9 cremes e 7 manteigas)	qPCR (<i>IS1111 e IS30A</i>)	64% (129/201)	Nenhuma célula <i>C. burnetii</i> viável
Khanzadi et al., (2014)	Irã	147 produtos (28 queijos, 26 iogurtes, 23 leite de ovelhas, 10 leite de cabras e 60 de leite bovino)	nPCR (<i>IS1111</i>)	7,4% queijos, 7,69% iogurtes, 34,78% leite de ovelha e 3,3% leite bovino	
Valergakis et al., (2015)	Inglaterra	155 amostras de leite bovino	qPCR (<i>FQ</i>)	69,70%	
Galiero et al., (2016)	Itália	84 queijos de cabras e ovelhas	qPCR (<i>IS1111</i>)	23,8%queijo produzido de leite pasteurizado e 32,14% não pasteurizado	
Nokhoulian et al., (2017)	Irã	1852 de leite (bovino, caprino e ovino)	nPCR e qPCR(<i>com1, 16S rRNA, IS1111</i>)	9,72% bovino, 2,6% caprino e 2,54% ovino	
Seo et al., (2017)	Coreia do Sul	108 leite bovino	nPCR(<i>16S rRNA</i>)	17,80%	
Barandika et al., (2019)	Espanha	67 queijos (ovelhas) >2 meses	qPCR (<i>IS1111</i>)	29,90%	<i>C. burnetii</i> viável em 5 queijos
Mioni et al., (2019a)	Brasil	112 leite bovino	qPCR (<i>IS1111</i>)	3,70%	
Rozental et al., (2020)	Brasil	53 queijos de leite bovino	nPCR (<i>IS1111</i>)	9,43%	

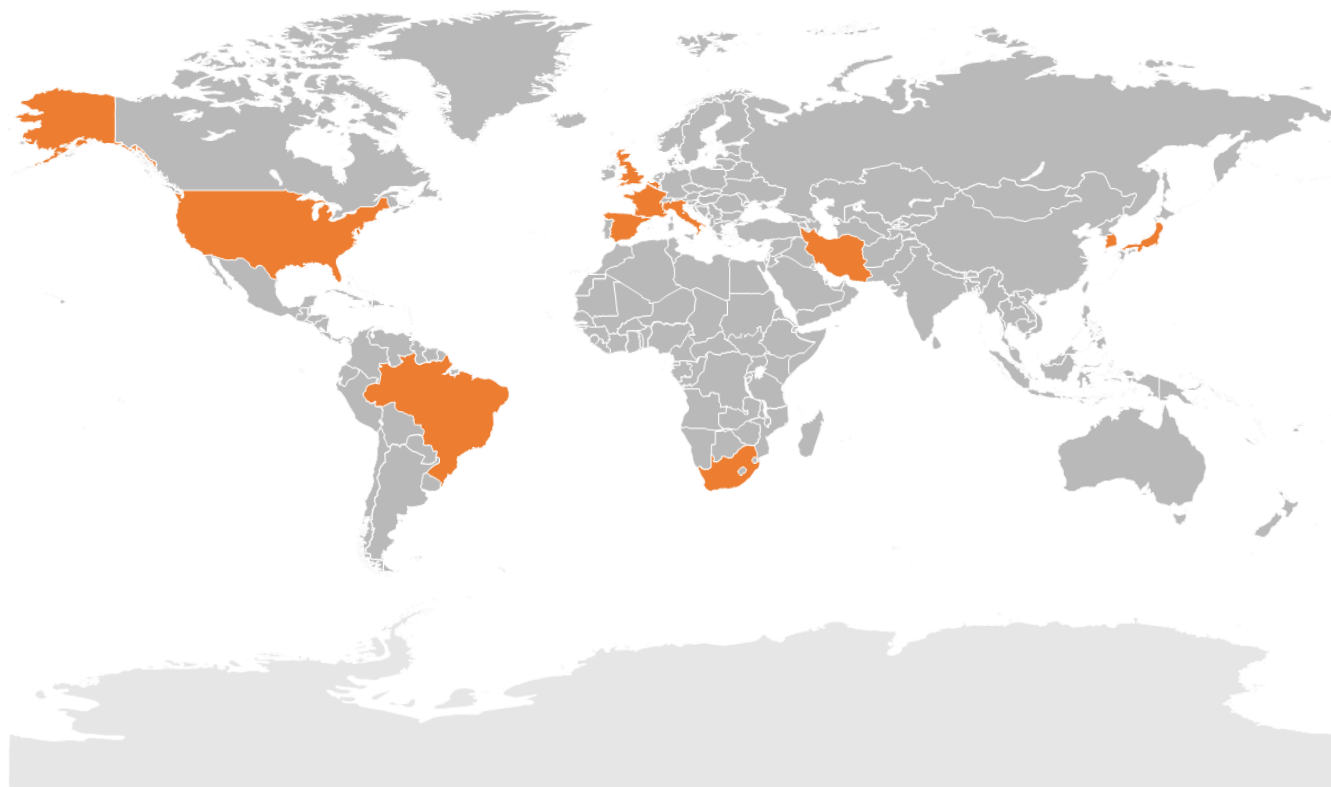


Figura1: Mapa evidenciando a localização de estudos sobre detecção de *C. burnetii* em produtos lácteos no mundo.

Autoria: Camila de Fátima Nascimento

3.2. Queijo Minas Artesanal e a produção em Patos de Minas- Minas Gerais

O Queijo Minas Artesanal (QMA) é um dos mais antigos e tradicionais queijos produzidos no Brasil (Dores e Ferreira, 2012). Desde 2008, o queijo artesanal mineiro é reconhecido como patrimônio imaterial de Minas Gerais pelo IPHAN (Instituto Nacional de História e Patrimônio Cultural) (BRASIL, 2008).

Em 2018, o estado de Minas Gerais instituiu um Programa de Certificação de Produtos Agropecuários e Agroindustriais com a finalidade de incentivar a legalização dos produtores e assegurar a qualidade desses produtos, porém apenas 35 produtores são registrados pelo Selo Arte e 245 produtores são cadastrados no Instituto Mineiro de Agropecuária-IMA (BRASIL, 2018).

De acordo com a legislação, os Queijos Artesanais são elaborados com leite integral fresco e cru, com adição de soro endógeno conhecido como “pingo” (Brasil, 2018). A produção desses queijos garante a renda de muitas famílias, porém muitas vezes são produzidos e comercializados de maneiras informais, geralmente em feiras ou por ambulantes sem os cuidados necessários na produção e conservação, além de não passarem por controle de qualidade e inspeção (Amorim et al., 2014; Rozental et al., 2018).

A produção e consumo do queijo Minas Artesanal é tradicionalmente parte da cultura e história do Estado. O governo de Minas Gerais reconhece oficialmente apenas sete regiões produtoras de queijo Minas Artesanal: Araxá, Cerrado, Serra da Canastra, Serro, Serra do Salitre, Triângulo Mineiro e Campo das Vertentes (MINAS GERAIS, 2017).

A Pesquisa da Pecuária Municipal (PPM) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) confirma que Minas Gerais é líder nacional de produção de leite com 8,9 bilhões de litros em 2018. O Município de Patos de Minas (MG) produziu 193 milhões de litros, ocupando a segunda posição no ranking nacional, atrás apenas de Castro (PR) com 292 milhões de litros e grande parte dessa produção foi destinada a produção do queijo tipo Minas Artesanal (IBGE, 2018).

Situado na região do Cerrado, uma das sete regiões produtoras do queijo Minas Artesanal, o Município de Patos de Minas (Figura 1), possui grande número de produtores de queijo Minas Artesanal fabricados e comercializados informalmente, ou seja, sem registro nos órgãos reguladores.

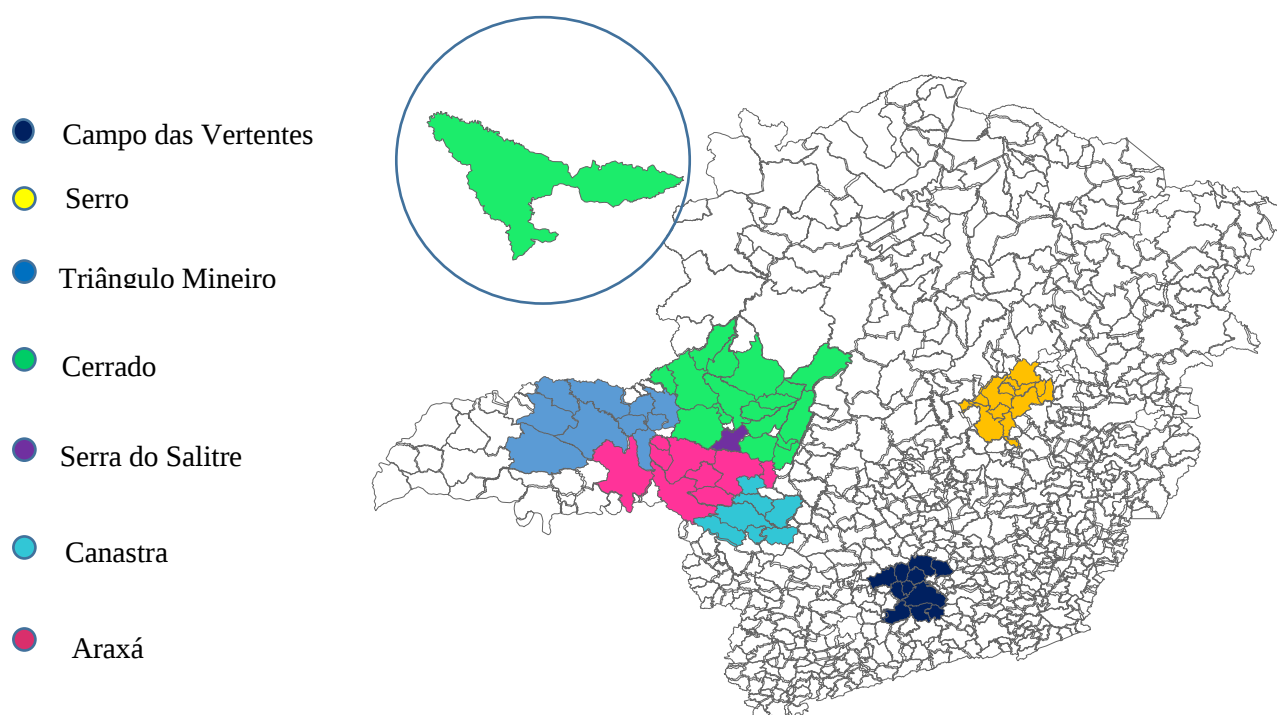


Figura 2: Mapa das sete regiões produtoras do Queijo Minas Artesanal, reconhecidas pelo governo do Estado de Minas Gerais e, em destaque, o Município de Patos de Minas, localizado na região do Cerrado.

Fonte: Emater 2015 com adaptações.

3.3. Consumo de produtos lácteos informais

O consumo e comércio do leite *in natura* é proibido no Brasil (Brasil, 2017), apesar disso, alguns estudos relataram o consumo de leite e produtos lácteos informais em várias regiões do País como no Estado de Minas Gerais (18,49%) (Pieri et al., 2014), em Alagoas (22,4%) (Ferreira et al., 2017), Pernambuco (26,6%) (Liro et al., 2011) e no Paraná (17,6%) (Raymundo et al., 2018).

No Município de São José do Rio Preto, São Paulo, Vidal-Martins et al. (2013), relataram que 97,76% (787/805) dos entrevistados consumiam leite e/ou seus derivados e 30% desses produtos eram obtidos por meios informais no comércio do Município.

A preferência dos consumidores por produtos lácteos informais é atribuída à características sensoriais, melhor sabor, por ser mais saudável, produto fresco e conter menos conservantes, e ao preço mais acessível (Vidal-Martins et al., 2013; Ferreira et al., 2017; Raymundo et al., 2018). Este consumo de leite cru vendido

informalmente está associado à falta de conhecimento dos riscos que esse produto pode ocasionar a saúde dos consumidores (Pieri et al., 2014).

4. REFERÊNCIAS

Amorim ALB, Couto EP, Santana AP, Ribeiro JL, Ferreira MA (2014) Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo Minas padrão de produção industrial, artesanal e informal. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** 73:364-7.

Anderson A, Bijlmer H, Fournier P-E, 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. **Morbidity and Mortality Weekly Report** 62:1–30.

Angelakis E, Raoult D (2010) Review Q fever. **Veterinary Microbiology** 140:297-309.

Amitai Z, Bromberg M, Bernstein M, Raveh D, Keysary A, David D, Pitlik S, Swerdlow D, Massung R, Rzotkiewicz S, Halutz O, Shohat T (2010) A Large Q Fever Outbreak in an Urban School in Central Israel, **Clinical Infectious Diseases** 50:1433–1438.

Babudieri B, Moscovici C (1950) Behaviour of *Coxiella burnetii* with physical and chemical treatment, **Rend Inst Sup Di Sanità J** 13:739-48.

Babudieri B (1959) Q fever: a zoonosis. **Advances in Veterinary Science** 5:422. Apud Eldin C, Mélenotte C, Mediannikov O, Ghigo E, Million M, Edouard S, Mege J, Maurin M, Raoult D (2017) From Q fever to *Coxiella burnetii* infection: a paradigm change. **Clinical Microbiology Reviews** 30:115-190.

Barandika JF, Alvez-Alonso R, Jado I, Hurtado A, Garcia-Pérez AL (2019) Viable *Coxiella burnetii* in hard cheeses made with unpasteurized milk. **International Journal of Food Microbiology** 303:42-45.

Borriello G, Galiero G (2012) *Coxiella burnetii*. In: Lorenzo-Morales J, organizador. **Zoonosis** 5:65-88.

Bouvery NA, Souriau A, Lechopier P, Rodolakis A (2003) Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: excretion routes. **Veterinary Research** 34:423-

433.

Brandão H, Valle LAR, Christovão DA (1953). Investigação sobre a febre Q em São Paulo. 1. Estudo sorológico em operários de um frigorífico. **Arquivo da Faculdade Higiene e Saúde Publica Universidade de São Paulo** 7:127-134.

BRASIL, Ministério da Saúde (2010). Situação epidemiológica das zoonoses de interesse para a saúde pública. **Boletim eletrônico Epidemiológico**, Ano 10, n. 2. Disponível em: www.saude.gov.br/svs Acesso em: 27 de março de 2019.

BRASIL, Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA-Instrução Normativa Nº 50 de 24 de setembro de 2013.

BRASIL. **Decreto Nº 9.013, de 29 de março de 2017** – Regulamenta a Lei no 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei no 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Brasil: Diário Oficial da União - Seção 1, no 62, 30 de Março de 2017.

BRASIL. Minas Gerais (estado). **Portaria 1859, de 31/8/2018 (Instituto Mineiro de Agropecuária - IMA)**. Diário do Executivo 4 out 2018. Acesso 03/02/2020.

BRASIL. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) Parecer n. 006/2006 Processo n. 01450.012192/2006-65, referente ao registro dos queijos artesanais de Minas no Livro de Registro dos Saberes. Brasília, 2006b.

BRASIL, Instituto Brasileiro Geografia Estatísticas (IBGE), **Portal do IBGE Ano 2018**. Disponível: <https://www.ibge.gov.br>, Acesso: 22/Maio/2020.

Brown GL, Colwell DC, Hooper WL (1968) An outbreak of Q fever in Staffordshire. **Journal of Hygiene** 66:649–655.

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). **American Journal Tropical Medicine and Hygiene** 75:33-5.

Capuano F, Mancusi A, Casalnuovo F, Perugini A, Proroga Y, Guarino A, Berri M, (2012) Real-time PCR-based detection of *Coxiella burnetii* in cheeses. **European Food Research and Technology** 235:181-186.

Clark WH, Lennette EH, Railsback OC, Romer MS (1951). Q fever in California VII. Clinical Features in One Hundred Eighty Cases. **AMA Archives of Internal Medicine** 88:155–167.

Centers for Disease Control and Prevention. Bioterrorism agents/ diseases [cited 2018 Dec 22]. Disponível em: <https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist.asp>
Centers for Disease Control and Prevention. Bioterrorism agents/ diseases. Disponível em: <https://www.cdc.gov/qfever/treatment/index.html>

Coleman AS, Fischer ER, Howe D, Mead DJ, Heinzen RA (2004) Temporal analysis of *Coxiella burnetii* morphological differentiation. **Journal of Bacteriology** 186:7344-7352.

Coleman AS, Fischer ER, Cockrell DC, Voth DE, Howe D, Mead D, Samuel JE, Heinzen RA (2007). Proteome and antigen profiling of *Coxiella burnetii* developmental forms. **Infection and Immunity, Bethesda**, v. 75, n. 1, p. 290-298.

Costa PSGD, Brigatte ME, Greco DB (2005) Antibodies to *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Ehrlichia chaffeensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 100:853-859.

Costa PSGD, Brigatte ME, Greco DB (2006). Questing one Brazilian query: reporting 16 cases of Q fever from Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical** 48(1):5-9.

Cicuttin GL, Degiuseppe JI, Mamianetti A, Corin MV, Linares MC, De Salvo MN, Dohmen FEG (2015) Serological evidence of *Rickettsia* and *Coxiella burnetii* in humans of Buenos Aires, Argentina. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases** 43:57-60.

Czaplicki G, Houtain JY, Mullender C, Manteca C, Saegerman C (2009) Bulk tank milk, reliable tool for diagnosing Q Fever in dairy herds? **Épidémiol et Santé Animale** 56:117-127.

Dahlgren FS, McQuiston JH, Massung RF, Anderson AD (2015) Q Fever in the United States: Summary of Case Reports from Two National Surveillance Systems, 2000–2012. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene** 92:247–255.

Davoust B, Marié JL, de Santi VP, Berenger JM, Edouard S, Raoult D (2014). Three-toed sloth as putative reservoir of *Coxiella burnetii*, Cayenne, French Guiana.

Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v. 20, n. 10, p. 1760.

Delsing CE, Kullberg BJ, Bleeker-Rovers CP (2010). Q fever in the Netherlands from 2007 to 2010. **Neth J Med**, 68(12):382-387.

Dores MT, Ferreira CLLF (2012) Queijo Minas Artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável** 2:26-34.

Dupuis G, Petite J, Peter O, Vouilloz M (1987) An Important Outbreak of Human Q Fever in a Swiss Alpine Valley. **International Journal of Epidemiology** 16:282-287.

European Food Safety Authority. Scientific opinion on Q fever. EFSA J. 8 (2010). <http://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1595>.

Eldin C, Angelakis E, Renvoisé A, Raoult D (2013) *Coxiella burnetii* DNA, but not viable bacteria, in dairy products in France. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 88:765-769.

Eldin C, Mélenotte C, Mediannikov O, Ghigo E, Million M, Edouard S, Mege J, Maurin M, Raoult D (2017). From Q fever to *Coxiella burnetii* infection: a paradigm change. **Clinical Microbiology Reviews** 30:115-190.

Enright JB, Sadler WW, Thomas RC (1957) Thermal inactivation of *Coxiella burnetii* and its relation to pasteurization of milk. **Public Health Monography** 47:1-30.

Epelboin L, Chesnais C, Boullé C, Drogoul AS, Raoult D, Djossou F, Mahamat A (2012) Q Fever Pneumonia in French Guiana: Prevalence, Risk Factors, and Prognostic Score. **Clinical Infectious Diseases** 55:67–74.

Eraso-Cadena MP, Molina-Guzmán LP, Cardona X, Cardona-Arias JA, Ríos-Osorio LA, Gutierrez-Builes LA (2018) Serological evidence of exposure to some zoonotic microorganisms in cattle and humans with occupational exposure to livestock in Antioquia, Colombia. **Caderno de Saúde Pública**, 34:e00193617.

Faria LS (2017). **Prevalência e fatores de risco para *Coxiella burnetii* em queijos Minas artesanais da microrregião do Serro**. 67f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

Fenollar F, Thuny F, Xeridat B, Lepidi H, Raoult D (2006) Endocarditis after acute Q fever in patients with previously undiagnosed valvulopathies. **Clinical Infectious Diseases** 42:818–21.

Ferreira AGG, Lyra DG, Silva JCS, Soares FMF, Araújo CA (2017) Perfil dos consumidores de leite bovino in natura no município de Santana do Ipanema – Alagoas. **Nutritime Revista Eletrônica** 14:6056-6065.

Ferreira MS, Guterres A, Rozental T, Novaes RLM, Vilar EM, Oliveira RC, Fernandes J, Forneas D, Junior AA, Brandão ML, Cordeiro JLP, Alvarez MRDV, Althoff SL, Moratelli R, Cordeiro-Estrela P, Silva RC, Lemos ERS (2018) *Coxiella* and *Bartonella* spp. in bats (*Chiroptera*) captured in the Brazilian Atlantic Forest biome. **BMC Veterinary Research** 14:279.

Fishbein DB, Raoult D (1992) A cluster of *Coxiella burnetii* infections associated with exposure to vaccinated goats and their unpasteurized dairy products. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene** 47:35–40.

Fretz R, Schaeren W, Tanner M, Baumgartner A (2007) Screening of various foodstuffs for occurrence of *Coxiella burnetii* in Switzerland. **International Journal of Food Microbiology** 116:414-418.

Galiero A, Fratini F, Cammà C, Domenico MD, Curini V, Baronti I, Turchi B, Cerri D, (2016) Occurrence of *Coxiella burnetii* in goat and ewe unpasteurized cheeses: screening and genotyping. **Journal Food Microbiology** 237:47-54.

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 surveillance** 188: 20407.

Gimenez DF (1964) Staining *rickettsiae* in yolk sac cultures. **Stain Technology** 30: 135–137.

Guimarães MF, Araujo ADC, Freire DP, Machado DM, Martins NN, Moraes-Filho J, Horta MC (2017) Infection survey of *Rickettsia rickettsii* and *Coxiella burnetii* in sheep and goats from National Park of Serra das Confusões, Piauí. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 37:555-560.

González-Quijada S, Salazar-Thieroldt E, Mora-Simón MJ (2015) Persistent Q fever and ischaemic stroke in elderly patients. **Clinical Microbiology and Infection** 21:362-7.

Hatchette TF, Hayes M, Merry H, Schlech WF, Marrie TJ (2003) The effect of *C. burnetii* infection on the quality of life of patients following an outbreak of Q fever. **Epidemiology Infectious** 130:491–5.

Hirai A, Nakama A, Chiba T, Kai A (2012) Development of a Method for Detecting *Coxiella burnetii* in Cheese Samples. **Journal Veterinary Medicine Science**, 74:175–180.

Howe D, Mallavia LP (2000) *Coxiella burnetii* Exhibits Morphological Change and Delays Phagolysosomal Fusion after Internalization by J774A.1 Cells. **Infection and Immunity** 68:3815–3821.

Kazar J (1996) Q fever. In: Kazar, J., Toman, R. (Eds.), *Rickettsiae and Rickettsial Diseases*. **Slovak Academy of Sciences** 353– 362.

Kazar J (2005) *Coxiella burnetii* infection. **Academy of Science** 1063:105114.

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.

Kim SG, Kim EH, Lafferty CJ, Dubovi E (2005) *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples, United States. **Emerging Infectious Diseases** 11:619.

Khanzadi S, Jamshidi A, Razmyar J, Borji SH (2014) Identification of *Coxiella burnetii* by touch-down PCR assay in unpasteurized milk and dairy products in North - East of Iran. **Iranian Journal of Veterinary Medicine** 8:15-19.

Lang GH (1988) Serosurvey of *Coxiella burnetii* infection in dairy goat herds in Ontario. **Canadian Journal of Veterinary Research** 52:37–41.

Lamas CC, Rozental T, Bóia MN, Favacho AR, Kirsten AH, da Silva AP, Lemos ER (2009) Seroprevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in human immunodeficiency virus-positive patients in Jacarepaguá, Rio de Janeiro, Brazil. **Clinical Microbiology and Infection** 15:140-141.

Lamas CC, Ramos RG, Lopes GQ, Santos MS, Golebiovski WF, Weksler C, Ferraiuoli GID, Fournier PE, 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** 17:65-66.

Lemos ERS, Rozental T, Mares-guia MAM, Almeida DNP, 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** 11:85-87.

Lemos ERS, Rozental T, Siqueira BN, Júnior AAP, Joaquim TE, Silva RG, Leite CA, Arantes AA, Cunha MF, Borgh DP (2018) Q Fever in Military Firefighters during Cadet Training in Brazil. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene** 99: 303–305.

Liro CV, Granja REP, Zocche F (2011) Perfil do consumidor de leite no vale do rio São Francisco, Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira** 12:718-726.

Loftis AD, Priestley RA, Massung RF (2010) Detection of *Coxiella burnetii* in commercially available raw milk from the United States, **Food borne Pathogens and Diseases** 7:1453–1456.

Maltezou HC, Raoult D (2004) Q fever in children. **Lancet Infectious. Diseases** 2:686–691.

Mares-Guia MA, Rozental T, Guterres A, Gomes R, Almeida DN, Moreira NS, Barreira JD, Favacho AR, Santana AL, Lemos ER (2014) Molecular identification of the agent of Q fever–*Coxiella burnetii*– in domestic animals in State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 47:231-234.

Mares-Guia MAMM, Rozental T, Guterres A, Ferreira MDS, Botticini RDG, Terra AKC, Marraschi S, Bochner R, Lemos ERS (2016) Molecular Identification of Q Fever in Patients with a Suspected Diagnosis of Dengue in Brazil in 2013–2014. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene** 94:1090-1094.

Mares-Guia MAMM, Guterres A, Rozental T, Ferreira MS, Lemos ERS (2018) Clinical and epidemiological use of nested PCR targeting the repetitive element IS1111 associated with the transposase gene from *Coxiella burnetii*. **Brazilian Journal of Microbiology** 4:138–143.

Marmion BP, Shannon M, Maddocks I, Storm P, Penttilä I (1996) Protracted debility and fatigue after acute Q fever. **Lancet** 347:977–8.

Marrero M, Raoult D (1989) Centrifugation-shell vial technique for rapid detection of Mediterranean spotted fever rickettsia in blood culture. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene** 40:197–199.

Maurin M, Raoult D (1999) Q Fever. **Clinical Microbiology Reviews** ; 12(4):518-553.

MINAS GERAIS. **Lei nº 23157, de 18 de dezembro de 2018**. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos Artesanais de Minas Gerais. Diário do Executivo, em 19 dez 2018. Disponível: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=372516>. Acesso em: 10/03/2020.

Mioni MSR, Ribeiro BLD, Peres MG, Teixeira WSR, Pelícia VC, Motta RG, Labruna MB, Ribeiro MG, Sidi-Boumedine K, Megid J (2019a). Real-time quantitative PCR-based detection of *Coxiella burnetii* in unpasteurized cow's milk sold for human consumption. **Zoonoses Public Health** 0:1–6.

Mioni MSR, Sidi-Boumedine K, Dalanezi FM, Joaquim SF, Denadai R, Teixeira WSR, Labruna MB, Megid J (2019b). New Genotypes of *Coxiella burnetii* circulating in Brazil and Argentina. **Pathogens** 9:30.

Njeru J, Henning K, Pletz MW, Heller R, Neubauer H (2016) Q fever is an old and neglected zoonotic disease in Kenya: a systematic review. **BMC Public Health** 16:297.

Nokhodian Z, Feizi A, Ataei B, Hoseini SG, Mostafavi E (2017). Epidemiology of Q fever in Iran: A systematic review and meta-analysis for estimating serological and molecular prevalence. **Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences** 22:121.

Oliveira JMB, Rozental T, Lemos ERS, Forneas D, Ortega-Morac LM, Porto WJN, Oliveira AAF, Mota RA (2018) *Coxiella burnetii* in dairy goats with a history of reproductive disorders in Brazil. **Acta Tropical** 183:19–22.

Oliveira GMB, Silva IWG, Evaristo AMCF, Serpa MCA, Campos ANS, Dutra V, Nakazato L, Aguiar DM, Labruna MB, Horta MC (2020) Tick-borne pathogens in dogs, wild small mammals and their ectoparasites in the semi-arid Caatinga biome, northeastern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases** 11:101409.

Ortolá RP, Peñalba GF, Ruiz JC, Ângulo AM (1992) Osteoarthritis por *Coxiella burnetii*. **Revista Clínica Española** 191:25–26.

Oyston PCF, Davies C (2011) Q fever: the neglected biothreat agent. **Journal Medicine and Microbiology** 60:9-21.

Palmer NC, Kierstead M, Key DW, Williams JC, Peacock MG, Vellend H (1983) Placentitis and Abortion in Goats and Sheep in Ontario Caused by *Coxiella burnetii*. **Canadian Veterinary Journal** 24:6061.

Parola P, Raoult TD (2001) Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 6, p. 897-928.

Pieri FA, Colombo M, Merhi CM, Juliati VA, Ferreira MS, Nero MA, Nero LA (2014) Risky Consumption Habits and Safety of Fluid Milk Available in Retail Sales Outlets in Viçosa, Minas Gerais State, Brazil, **Foodborne Pathogens and Diseases** 11.

Pérez-Arellano JL, Rodríguez CC, Gutierrez C, Rivero MB (2018) Epidemiología de la fiebre Q en España. **Revista Española de Quimioterapia** 31:386-405.

Radinovic M, Bobos S, Davidov I, Erdeljan M, Pajic M (2012) Presence of *Coxiella burnetii* of blood serum and concentration of IgG in infected cows. **African Journal of Microbiology Research** 7:444-448.

Rahimi E, Doosti A, Ameri M, Kabiri E, Sharifian B (2009) Detection of *Coxiella burnetii* by Nested PCR in Bulk Milk Samples from Dairy Bovine, Ovine, and Caprine Herds in Iran. **Zoonoses and Public Health** 57:38-41.

Ramos IAS, Mello VVC, Mendes NS, Zanatto DCS, Campos JBV, Alves JVA, Macedo GC, Herrera HM, Labruna MB, Pereira GT, Machado RZ, André MR (2020) Serological occurrence for tick-borne agents in beef cattle in the Brazilian Pantanal. **Brazilian Journal Veterinary and Parasitology** 29:e014919.

Raoult D, Tissot-Dupont H, Foucault C, Gouvernet J, Fournier PE, Bernit E, Stein A, Nesri M, Harle JR, Weiller PJ (2000) Q fever 1985–1998. Clinical and epidemiologic features of 1,383 infections. **Medicine** 79:109–123.

Raoult D, Marrie TJ, Mege JL (2005). Natural history and pathophysiology of Q fever. **The Lancet Infectious Diseases** 5:219-226.

Raymundo NKL, Bersot LS, Osaki SC (2017) Consumer profile and problems associated with uninspected raw milk consumption in western Paraná, **Arquivo do Instituto Biológico** 84: e0872016.

Ribeiro-Netto A, Nikitin T, Ribeiro IF (1964) Estudo sobre febre Q em São Paulo: Prevalência em ordenhadores e tratadores de bovinos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical** 6:255-257.

Riemann HP, Brant PC, Franti CE, Reis R, Buchanan AM, Stormont C, Behymer DE (1974) Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Coxiella burnetii* among students and other personnel in veterinary colleges in California and Brazil. **American Journal of Epidemiology** 100:197-208.

Riemann, HB (1975) *Toxoplasma gondii* and *Coxiella burnetii* antibodies among Brazilian slaughterhouse employees. **American Journal of Epidemiology** 102:386-393.

Rodolakis A, Berri M, Héchard C, Caudron C, Souriau A, Bodier CC, Blanchard B, Camuset P, Devillechaise P, Natorp JC, Vadet JP, ArricauBouvery N (2007) Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine, and ovine herds. **Journal Dairy Science** 90:5352-5360.

Rozental T, Mascarenhas LF, Rozenbaum R, Gomes R, Mattos GS, Magno CC, Almeida DN, Rossi MID, Favacho ARM, Lemos ERS (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. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz** 107:695697.

Rozental T, Ferreira MS, Guterres A, Mares-Guia MMA, Teixeira BR, Gonçalves J, Bonvicino CR, D'Andrea OS, Lemos ERS (2017) Zoonotic pathogens in Atlantic Forest wild rodents in Brazil: *Bartonella* and *Coxiella* infections. **Acta Tropical** 168 64-73.

Rozental T, Silva ASV, Oliveira RC, Favacho ARM, Oliveira MLA, Bastos FI, Lemos ERS (2018) Seroprevalence of *Bartonella spp.*, *Coxiella burnetii*, and *Hantavirus* among people who inject drugs in Rio de Janeiro, Brazil: a retrospective assessment of a biobank. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 60:e31.

Rozental T, Faria LSF, Silva MR, Forneas D, Guterres A, Ribeiro JB, Araújo FR, Lemos ERS (2020) First molecular detection of *Coxiella burnetii* in Brazilian artisanal cheese: a neglected food safety hazard in ready-to-eat raw-milk product *Coxiella burnetii* in raw-milk cheese. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**

984:1-5.

Ruiz-Fons F, Rodríguez O, Torina A, Naranjo V, Gortázar C, de La Fuente J (2008) Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in wild and farmed ungulates. **Veterinary Microbiology** 126:282- 286.

Santos AS, Bacellar F, França A (2007) Febre Q: revisão de conceitos **Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna** 14(2):90-99.

Shannon J, Heinzen RA (2009). Adaptive Immunity to the Obligate Intracellular Pathogen *Coxiella burnetii*. **National Institutes of Health**, 43(1-3):138-148.

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 (2003) Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 100:5455-5460.

Seo M, Ouh I, Kwak D (2018) Herd prevalence and genotypes of *Coxiella burnetii* in dairy cattle bulk tank milk in Gyeongsang provinces of South Korea. **Tropical Animal Health and Production** 50:1399–1404.

Signs KA, Stobierski MG, Gandhi TN (2012) Q fever cluster among raw milk drinkers in Michigan, 2011. **Clinical Infectious Diseases** 55:1387–9.

Speelman P (2010) The largest Q fever outbreak ever reported. *Journal of Medicine* 68:380-1.

Siciliano RF, Ribeiro HB, Furtado Remo HM, Castelli JB, Sampaio RO, Santos FCP, Colombo S, Grinberg M, Strabelli TMV (2008) Endocardite por *Coxiella burnetii* (febre Q). Doença rara ou pouco diagnosticada? Relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 41:409-412.

Siciliano RF, Castelli JB, Mansur AJ, dos Santos FP, Colombo S, do Nascimento EM, Paddock CD, Brasil RA, Velho PENF, Drummond MR, Grinberg M, Strabelli TMV (2015) Bartonella spp. and *Coxiella burnetii* associated with community-acquired, culture-negative endocarditis, Brazil. **Emerging infectious diseases** 21:1429.

Smith DJW (1940) Studies in the Epidemiology of Q Fever. The Transmission of Q Fever by the Tick *Haemaphysalis humerosa*. Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science, v. 18, n. pt. 2. Apud Eldin C, Mélenotte C, Mediannikov O, Ghigo E, Million M, Edouard S, Mege J, Maurin M, Raoult D (2017). From Q fever to *Coxiella burnetii* infection: a paradigm change. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 30, n. 1, p. 115-190.

Souza EAR, Castro EMS, Oliveira GMB, Azevedo SS, Peixoto RM, Labruna MB, Horta MC (2018) Serological diagnosis and risk factors for *Coxiella burnetii* in goats and sheep in a semi-arid region of Northeastern Brazil, **Brazilian Journal Veterinary Parasitology** 27:514-520.

Tellez A, Martin A, Anda P, De la Fuente L, Benitez P, Garcia C, Leon P (1989) Study of *C. burnetii* human and animal seroprevalence in a rural population in Madrid community. **European Journal of Epidemiology** 5:444-6.

Tissot-Dupont H, Raoult D (2008) Q fever. **Infectious Diseases Clinics of North America** 22:505-514.

To H, Htwe KK, Kako N, Kim HJ, Yamaguchi T, Fukushima H, Hirai K (1998) Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle with reproductive disorders. **Journal of Veterinary Medical Science** 60:859-861.

Vaidya VM, Malik SVS, Kaur S, Kumar S, Barbuddhe SB (2008). Comparison of PCR, immunofluorescence assay, and pathogen isolation for diagnosis of Q fever in humans with spontaneous abortions. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n. 6, p. 2038-2044.

Valle LAR, Brandão H, Christovão DA, D'Apice M (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** 9:167-180.

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. **European Journal of Epidemiology** 16:469-76.
Valergakis GE, Russell C, Grogono-Thomas R, Bradley AJ, Eisler MC (2015) *Coxiella burnetii* in bulk tank milk of dairy cattle in south-west England. **Veterinary Record**, 171:156.

Van Schaik EJ, Chen C, Mertens K, Weber MM, Samuel JE (2013) Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. **Nature Reviews Microbiology**11:561-573.

Vidal-Martins AMC, Bürger KP, Gonçalves ACS, Grisólio APR, Aguilar CEG, Rossi GAM (2013) Avaliação do consumo de leite e produtos lácteos informais e do conhecimento da população sobre os seus agravos à Saúde Pública, em um município do estado de São Paulo, Brasil. **Boletim da Indústria Animal** 70:221-227.

Widmer CE, Azevedo FCC, Almeida AP, Ferreira F, Labruna MB. (2011) Tick-Borne Bacteria in Free-Living Jaguars (*Panthera onca*) in Pantanal, Brazil. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**11:1001-5.

Wildman MJ, Smith EG, Groves J, Beattie JM, Caul EO, Ayres JG. Chronic fatigue following infection by *Coxiella burnetii* (Q fever): ten-year follow-up of the 1989 UK outbreak cohort. QJM. 2002; 95 (8):527–38. Epub 2002/07/30. PMID: 12145392.

Zanatto DCS, Duarte JMB, Labruna MB, Tasso JB, Calchi AC, Machado RZ, André MR (2019a). Evidence of exposure to *Coxiella burnetii* in neotropical free-living cervids in South America, **Acta Tropical** 197.

Zanatto DCS, Gatto IRH, Labruna MB, Jusi MMG, Samara SI, Machado RZ, André MR, (2019b) *Coxiella burnetii* associated with BVDV (Bovine Viral Diarrhea Virus), BoHV (Bovine Herpesvirus), *Leptospira spp.*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma vivax* in reproductive disorders in cattle. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology** 28:245-257.

CAPÍTULO 2 - Molecular Detection of *Coxiella burnetii* in Unstandardized Minas Artisanal Cheese Marketed in Southeastern Brazil¹

Camila de Fátima **Nascimento**^{a,b}; Victória Valente Califre de **Melo**^b; Rosângela Zacarias **Machado**^b; Marcos Rogério **André**^b; Karina Paes **Bürger**^{b*}

^aPrograma de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, São Paulo, Brasil

^bDepartment of Veterinary Pathobiology and Theriogenology Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) - UNESP Jaboticabal, SP

*Corresponding author:

Laboratório de Saúde Pública, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Campus de Jaboticabal, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Zona Rural, CEP: 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

E-mail address: karina.burger@unesp.br

Abstract

Q fever is a zoonosis caused by *Coxiella burnetii*; it can be transmitted through the consumption of dairy products, but it has not been adequately described. Therefore, the present study aimed to investigate the presence of *C. burnetii* in 87 samples of unstandardized Minas artisanal cheeses sold in Minas Gerais, southeastern Brazil. The cheese samples were analyzed using the quantitative real-time PCR (qPCR) technique and subsequently, the positive samples were sequenced. In addition, 150 people were interviewed to outline the profile of consumers and the consumption of non-inspected dairy products. The results showed that 4.6% (4/87) of the samples analyzed using qPCR were positive for *C. burnetii*, with 99.84% identity with the 16S gene. The responses from the interviews indicate that 95.3% (143/150) of the respondents consume milk and dairy products; 50% (75/150) consume fresh Minas artisanal cheese and milk at least once a day; 64.58% (93/144) do not check the

inspection stamps on the packaging at the time of purchase; and 81.56% (122/1¹46) do not know the meaning of these stamps. Thus, the presence of *C. burnetii* DNA in the analyzed cheeses and the consumption of unstandardized dairy products raise an alert for the risk of transmission of Q fever in the population that consumes them.

Keywords: Q fever, Public Health, Zoonoses

¹Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Acta Tropica em 02/02/2021 e encontra-se em avaliação para publicação.

1. Introduction

Coxiella burnetii, the etiologic agent of the zoonosis, Q fever, is a gram-negative, obligate and highly resistant intracellular bacilloccoccus (CDC, 2019). This zoonosis is characterized by nonspecific clinical signs, such as febrile seizures; conditions such as pneumonia, hepatitis, and in some cases, pericarditis, myocarditis, encephalitis, and osteomyelitis are also observed (Tissot-Dupont and Raoult, 2008). The non-specificity of the clinical signs can lead to under-detection of this disease and the treatment of cases that are similar to other viral and bacterial infections (Eraso-Cadena et al. 2018).

The transmission of this zoonosis occurs mainly through inhalation of aerosols, as infected animals can eliminate large amounts of bacteria through the placenta, amniotic fluid, feces, urine, and milk. However, it must be noted that the consumption of unpasteurized milk or its derivatives contaminated by *C. burnetii* is the means of transmission of Q fever to humans (Gale et al. 2015).

In the state of Minas Gerais, Brazil, the production and consumption of Minas artisanal cheese is traditionally a part of the culture and history of the state. The government of Minas Gerais officially recognizes only seven regions that produce Minas artisanal cheese: Araxá, Cerrado, Serra da Canastra, Serro, Serra do Salitre, Triângulo Mineiro, and Campo das Vertentes (BRASIL, 2018).

According to the law, artisanal cheeses are made with fresh and raw whole milk. The production of these cheeses guarantees the income of many families; however, they are often produced and marketed through unstandardized methods, usually at fairs or by street vendors, without undergoing quality control and inspection (Amorim et al. 2014). Little is known about the real situation regarding the

consumption and commercialization of unstandardized products such as milk and dairy products in Brazil, but some studies have associated the consumption of these products with the lack of knowledge of the risks these products can cause to the health of consumers. (Vidal-Martins et al. 2013; Pieri et al. 2014; Raymundo et al. 2017).

Epidemiological evidence of the association of Q fever outbreaks with the consumption of unpasteurized dairy products has been reported in several studies (Fishbein and Raoult, 1992; Sings et al. 2012). In Brazil, studies on the presence of *C. burnetii* in dairy products and its implications on public health are scarce. Thus, it is necessary to investigate the presence of this agent in unstandardized artisanal dairy products marketed. This study aimed to investigate the presence of *C. burnetii* in unstandardized Minas artisanal cheeses marketed in the State of Minas Gerais, southeastern Brazil.

2. Material and Methods

2.1. Study area and sample design

The municipality of Patos de Minas is located in the Cerrado Mineiro region. This region is one of the seven regions that produce large quantities of Minas artisanal cheese and is recognized by the government of the State of Minas Gerais, Brazil.

For sample design, an expected prevalence of 10% of *C. burnetii* in samples of Minas artisanal cheeses from the Serro microregion was considered, according to a study carried out by Rozental et al. (2020), with a 95% confidence level and an estimated error of 6%, according to data analyzed using in the program Epi Info 7.2.2.

2.2. Sample collection

During the period from January to May 2020, 96 samples of artisanal cheeses produced (2–3 days of production) from raw or fresh milk, and marketed without inspection of the original product by the inspection agencies, were purchased from small, medium, and large markets, open markets, and municipal markets in the municipality. The samples of the purchased artisanal cheeses were identified, refrigerated ($< 4\text{ }^{\circ}\text{C}$), stored in isothermal boxes, and sent to the laboratory for processing.

2.3. DNA extraction and quality assessment

Twenty-five grams (25 g) of each cheese sample was weighed aseptically and transferred to a sterile plastic bag, and then homogenized with 25 mL of PBS (phosphate buffered saline) at pH 7.4. DNA extraction was performed using a commercial kit (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen™, Valencia, California, USA), according to the manufacturer's instructions. DNA quality was assessed by measuring the concentrations at absorbances of 260/280 and 260/230 nm, using a spectrophotometer (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA).

To verify the absence of inhibitors in the DNA samples, a conventional PCR assay was performed based on the endogenous glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) gene in mammals (Birkenheuer et al. 2003).

2.4. Quantitative real-time PCR (qPCR)

The samples positive for the *GAPDH* gene from the PCR assay were subjected to quantitative real-time PCR (qPCR) assay for *C. burnetii* based on the *IS1111* gene according to the protocol by Klee et al. (2006), with some modifications.

The qPCR assays were performed in 10 µL total volume of reaction mixtures, containing 1 µL of DNA sample, 0.3 µM of each primer and hydrolysis probe, 5.0 µL of 2 × Master Mix buffer (GoTaq™ Probe qPCR Master Mix, Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA), and ultra-pure sterile water (Nuclease Free, Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) q.s.p. 3.1 µL. The amplification conditions were 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min followed by 44 cycles at 95 °C for 15 s and 58 °C for 30 s. PCR amplifications were performed on Low-multiplate PCR plates (BioRad™, Hercules, California, USA) using a CFX96 thermal cycler (BioRad™, Hercules, California, USA). The standard curves were constructed with serial dilutions of the plasmid DNA (gBlocks® - Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA) (2.0×10^7 – 2.0×10^0 copies/mL), which encoded a fragment of 295 bp gene. The number of plasmid copies was determined according to the formula: $(XG/\mu\text{L of DNA}/[\text{Plasmid size (bp)} \times 660]) \times 6, 22 \times 10^{23} \times \text{plasmid copies}/\mu\text{L}$.

All the DNA samples were initially tested in duplicates. All the duplicates whose Cq difference was greater than 0.5 were tested again in triplicates. The amplification efficiency (E) was calculated from the slope of the standard curve in each run, using the following formula ($E = 10^{-1/\text{slope}}$) (Bustin et al. 2009).

2.5. Amplification of *C. burnetii* DNA using nested PCR (nPCR)

The positive samples in the qPCR for the IS1111 gene were subsequently subjected to nPCR assays based on the 16S rDNA gene with 625 bp, using the protocol established by Duron et al. (2014). The products of the PCR assays were subjected to horizontal electrophoresis on 1.0% agarose gel stained with ethidium bromide.

2.6. DNA purification

The PCR product was purified before being sent for sequencing. The ExoSAP-IT Express PCR Cleanup reagent kit (Thermo Fisher Scientific®) was used according to the manufacturer's protocol. The quantification of the total genomic material of the purified product was performed in a nanodrop apparatus (Thermo Fisher Scientific®).

2.7. Sequencing

The amplified and purified products were sequenced using an automated technique based on the dideoxynucleotide chain termination method (Sanger et al. 1977). The oligonucleotide primers used were the same as those used in PCR. The sequencing was performed on the ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems) sequencer.

The quality of the electropherograms generated after sequencing was analyzed using the PhredPhrap software (Ewing et al. 1998); only the bases that presented “Phred” score of 20 or above were considered. The BLASTn program was used to compare the sequences obtained with those displayed in the Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) (Altschul et al. 1990).

2.8. Identification of the profile of consumers of dairy products and statistical analysis

A field survey was conducted in which 150 people were interviewed using a simplified questionnaire, which contained, in addition to identification data (gender and age), other questions, such as the habit of consuming fresh/cured Minas artisanal cheeses and other dairy products; if so, how often (daily, weekly, eventually or never); source of product acquisition (markets, fairs, street vendors, others); opinion on whether milk and dairy products can transmit diseases; and meaning of

the inspection stamps on the packages. Descriptive statistical analyses were performed, using absolute and relative frequencies. To verify the association between the variables investigated and the consumption of dairy products, a univariate analysis was performed using Fisher's exact test and Odds Ratio (OR) with a 95% confidence interval (Thrusfield, 2005). Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. The analyses were performed using the software Epi Info 7.22.

3. Results

In the PCR for the *GAPDH* gene, 87 of the 96 (90.6%) cheese samples were positive. *C. burnetii* DNA was present in 4.6% (4/87) of the samples analyzed using qPCR based on the *IS1111* gene. The positive cheese samples were from the same medium-sized establishment, but it is not known whether the cheeses were purchased from one or more producers supplying cheeses to that establishment.

The positive quantification for *C. burnetii* varied from 4.131×10^1 to 2.342×10^3 copies/ μ L (Table 1).

Table 1. Result of positive samples for *C. burnetii* using qPCR based on the *IS1111* gene.

ID	Cq (mean)	Nº copies/ μ L	Efficiency (%)	R ²	Slope	Y-int
47	30,35	$2,3425 \times 10^3$	104,3	0,999	-3,223	41,031
67	32,43	$4,131 \times 10^1$	104,3	0,999	-3,223	41,031
82	30,98	$1,3195 \times 10^3$	104,3	0,999	-3,223	41,031
L1	31,37	$1,0115 \times 10^3$	104,3	0,999	-3,223	41,031

Among the three sequences of positive samples, two sequences were of high quality, showing percentages of identity between 99.67% and 99.84% with the *C.*

burnetii sequences previously deposited in the GenBank (Table 2).

Table 2: Percentage of identity (BLASTn) of the 16S rRNA sequences of *C. burnetii*, obtained from unstandardized samples of Minas artisanal cheeses marketed in the Municipality of Patos de Minas, Minas Gerais, with sequences previously deposited in the GenBank.

ID	Species	Identity (%)	Country	Query cover (%) [*]	E value [*]	Access number Genbank
CN1/ 47	<i>C. burnetii</i>	99,84	China	80	0	MN880312-1
CN2 /82	<i>C. burnetii</i>	99,67	China	81	0	MN880312-1

^{*}Coverage values of the analyzed sequences

In the survey conducted to identify the profile of consumers, 66.6% (100/150) were female, 37.3% (56/150) were aged between 31 and 50 years, and 30% (45/150) had a family income between two and three wages (Table 3). With respect to consumption, 95.33% (143/150) of the respondents admitted to consuming milk and dairy products and 50% (75/150) admitted to consuming fresh Minas artisanal cheese and milk at least once a day (Table 4).

In the analysis of the consumer profile, a statistically significant association was observed for the variable: consumer who buys milk/dairy products directly from the producer ($p = 0.0446$) (Table 5)

Table3: Absolute and relative frequencies of the profile of consumers of dairy products interviewed in the municipality of Patos de Minas, Minas Gerais, 2020.

Consumption	Nº	%
Yes	143	95,33
No	7	4,66
Total	150	100
Gender	Nº	%
Male	50	33,3
Female	100	66,6
Total	150	100%
Age (years)	Nº	%
18–30	38	25,33
31–50	56	37,33
51–69	41	27,33
> 70	15	10,00
Total	150	100,00
Family income	Nº	%
1–2 salaries	35	23,33
2–3 salaries	45	30,00
3–4 salaries	25	16,66
4–5 salaries	24	16,00
> 5 salaries	21	14,00
Total	150	100,00
Education level	Nº	%
Unlettered	1	0,66
Not completed elementary school	16	10,66
Completed elementary school	6	4,00
Not completed high school	14	9,33
Completed high school	64	42,66
Not completed higher education	12	8,00
Graduate	22	14,66
Postgraduate	15	10,00
Total	150	100,00

Table 4: Absolute and relative frequencies of respondents' level of consumption of milk and milk products

Products	More than once a day	%	Daily	%	Weekly	%	Eventually	%	Do not consume	%	Total
Milk	40	26,6	75	50	12	8	16	10,3	7	4,6	150
MAC* fresh	20	13,3	75	50	20	13,3	26	17,3	9	6	150
MAC* hard	1	0,6	14	9,3	35	23,3	65	43,3	35	23,3	150
Mozzarella	5	3,3	37	24,6	26	17,3	54	36	28	18,6	150
Curd	1	0,6	10	6,6	16	10,6	53	35,3	70	46,6	150
Yogurt	3	2	36	24	29	19,3	54	36	28	18,6	150
Butter	6	4	55	36,6	24	16	34	22,6	31	20,6	150

*MAC-Minas Artisanal Cheese

Table 5: Variables analyzed using Odds Ratio and Fisher's exact test, based on the responses of respondents in establishments in the Municipality of Patos de Minas, Minas Gerais 2020.

Variable	Total	Consumes	Frequency (%)	OR* 2,81	IC % 0,60–13,08	P
Gender						
Male	50	46	92		80,77–97,78	0.2245
Female	100	97	97		91,48–99,38	
Income						
1–2 salaries	35	31	88,57		73,26–96,80	0.2702
2–3 salaries	46	45	97,83		88,47–100	
3–4 salaries	25	25	100		86,28–100	
4–5 salary	23	22	95,65		78,05–99,89	
>5 salary	21	20	95,24		76,18–99,88	
Education level						
Unlettered/Not completed elementary school	18	16	88,89		65,29–100	0.3734
Completed elementary school/Not completed high school	20	20	97,83		83,16–100	
Completed high school/Not completed higher education	76	73	100		88,89–99,18	
Graduate/Postgraduate	36	34	96,05		81,34–99,32	
Where do you buy it?						
Supermarket	118	118	100		96,92–100	1,00
Market-place	19	19	100		82,35–100	
Municipal market	3	3	100		29,24–100	
Others	3	3	100		29,24–100	
Do you buy direct from a producer?						
Yes	57	57	100		93,73–100	0.0446
No	93	86	93,00		85,10–96,92	
Do you boil the milk?						
Yes	8	8	100		63,06–100	1.00
No	142	135	95,07		90,11–98,00	

Do you consume raw milk?					
Yes	6	6	100	54,07–100	1.00
No	144	137	95,14	90,24–98,02	
Do you check the packaging?					
Yes	51	51	100	93,02–100	1,00
No	93	92	98,92	94,15–99,97	
Do you know the acronyms?					
SIM ¹					
Yes	1	1	100	25,00–100	1.00
No	149	142	95,30	90,56–98,09	
SIF ²					
Yes	1	1	100	25,0–100	1.00
No	149	142	95,30	90,59–98,09	
IMA ³					
Yes	7	6	85,71	42,13–99,94	0.2894
No	143	137	95,80	91,09–98,44	
Do you know what the stamps indicate?					
Yes	24	24	100	85,75–100	0.2539
No	122	118	96,72	91,82–99,10	
Do you know milk/derivates can cause diseases?					
Yes	79	77	97,47	91,15–99,69	0.2888
No	70	65	92,86	84,11–97,64	
Have you/someone in your family ever been sick after consuming milk /derivatives?					
Yes	20	20	100	83,16–100	0.0975
No	128	122	95,31	90,08–98,26	

¹SIM- Municipal Inspection Service ²SIF- Federal Inspection Service ³IMA- Institute Mineiro Agropecuary

4. Discussion

The presence of *C. burnetii* DNA was detected in 4.6% (4/87) of unstandardized Minas artisanal cheese samples, all purchased from the same medium-sized establishments. qPCR analysis based on the *IS1111* gene showed high sensitivity (Klee et al. 2006), allowing the detection of the bacterium's DNA even at low concentrations.

The presence of *C. burnetii* DNA in cheeses in this study was lower than that reported by Rozental et al. (2020), who detected its presence in 9.43% (5/53) of Minas artisanal cheeses from agribusinesses registered and supervised by the Instituto Mineiro of Agriculture (IMA), the official organ of animal health defense of

the State of Minas Gerais. However, the prevalence of *C. burnetii* found in this study was higher than described by Mioni et al. (2019a) in (3.57%) in unpasteurized milk in of State of Goiás, Brazil.

The Minas artisanal cheese production chain is liable to contamination by *C. burnetii* either via the raw material resulting from positive cattle herds or via the manufacturing and storage processes of this product. In this study, the cheeses were purchased at the end of the production chain; therefore, it is not known when these cheeses were contaminated by the Q fever agent.

Other studies have demonstrated the presence of *C. burnetii* in milk and dairy products in several countries such as the United States 42.9% (9/21) (Loftis et al. 2010), Italy 21.3% (42/196) (Capuano et al. 2012), France 64 % (129/201) (Eldin et al. 2013), and Spain 29.9% (20/67) (Barandika et al. 2019).

The municipality of Patos de Minas in Minas Gerais, ranks second in the national ranking for milk production, produced 193 million liters in 2018, and a large part of this was used in the production of Minas artisanal cheese (BRASIL, 2018). Milk produced in Brazil has, in general, high counts of microorganisms, depicting poor production hygiene (Langoni et al. 2011). In this context, *C. burnetii* stands out, which since 1956, has been considered the standard microorganism for milk pasteurization temperature due to its high thermal resistance and pathogenicity (Enright et al. 1957).

The consumption of milk and unstandardized dairy products has been reported in the State of Minas Gerais (18.49%) (Pieri et al. 2014), Alagoas (22.4%) (Ferreira et al. 2017), and Paraná (17.6%) (Raymundo et al. 2017). In the present study, although it is not known how many of the respondents consume

unstandardized dairy products, it was found that a significant number of the consumers purchase dairy products directly from the producers ($p = 0.0446$).

Given the importance of inspection service of products of animal origin for consumption, the preference for the place of purchase variable does not have significant value in this study ($p=1,00$), however 82.51% (118/147) of the interviewees answered that they buy milk and dairy products in supermarkets and that the cheese contaminated by *C. burnetii* comes from this type of establishment. In addition, 64.58% (93/144) of the interviewees replied that they did not check the packaging and 81.56% (122/146) said they did not know what the stamps on the packaging indicate. Similar results were obtained by Pieri et al. (2014), in which the authors associated the consumption of raw milk sold informally with the lack of knowledge of the risks that this product can cause to health.

The cheeses analyzed in this study were purchased with 2–3 days of shelf life in the establishments, which can be a viable means of transmitting bacteria to consumers of these products. *C. burnetii* can remain viable for 17 days, according to a study on experimentally contaminated cheeses in South Africa (Babudieri and Moscovici, 1950), and the legislation determines a maturation period of 22 days for Minas artisanal cheese produced in this region (BRASIL, 2017).

A study found a higher positivity for *C. burnetii* in semi-hard and hard cheeses using qPCR based on the IS1111 gene, and suggests that longer maturation period, water activity (a_w), pH, and NaCl may interfere with the viability of *C. burnetii* in cheeses (Galiero et al. 2016). The present study did not use "cured" cheeses, that is, cheeses with a longer maturation period before the sale and consumption of the product. However, 9.3% (14/150) of the respondents consume this type of cheese

daily and 43.3% (65/150) eventually, which raises an alert for the consumption of this type of product.

The relationship between Q fever and the consumption of milk and its unpasteurized derivatives is not yet fully proven (EFSA, 2010) and needs to be better understood. The inhalation of aerosols from the placenta, amniotic fluid, feces, urine, and milk contaminated by *C. burnetii* is the main form of transmission of this infection to humans; however, the consumption of unpasteurized milk and dairy products must be considered a means of transmission of this pathogen. (Gale et al. 2015). The detection of *C. burnetii* DNA in cheeses in the present study does not prove the presence of viable bacteria in commercialized products. However, it is noted that the circulation of this pathogen in a region of high production of Minas artisanal cheeses presents a risk to the population that consumes this type of product.

Some actions are indicated for the control and prevention of *C. burnetii*, such as regular health check-ups of the herd, separation of ruminant females in the pre-partum period, appropriate disposal of placentas and fetal wraps, and the requirement of health certificates for the acquisition of animals (Rozental et al. 2020). There should also be restricted contact with wild animals and controlling ectoparasites in herds (Eraso-Cadena et al. 2018) that are used for the production of fresh milk cheese such as Minas artisanal cheeses.

5. Conclusion

The presence of *C. burnetii* DNA in unstandardized Minas artisanal cheeses marketed in the Municipality of Patos de Minas, Minas Gerais, and the constant consumption of these products can increase the risk of Q fever in its consumers. It is essential to adopt hygienic farming practices for managing livestock that are used in

the production of fresh milk cheese, as well as activities to raise awareness about the risks of consuming non-inspected products.

Declaration of Competing Interest

None.

Ethics Committee

This research was submitted to Plataforma Brasil and approved by the Research Ethics Committee UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - FCAV protocol- 3.992.966/2019.

Acknowledgments

We are thankful to the Veterinary Medicine Post-Graduation Program for the acquisition of materials used in the development of this research and to the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)” for the scholarship granted to Camila de Fátima Nascimento. We are also thankful to CNPq ((National Council for Scientific and Technological Development) for the Productivity Grant conceived to MRA (CNPq Process #302420 / 2017-7).

Funding: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

Altschul, SF, Gish, W., Miller, W., Myers, EW, 1990. Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol. 215, 403–410.

Amorim, ALB, Couto, EP, Santana, AP, Ribeiro, JL, Ferreira, MA, 2014. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo Minas padrão de produção industrial, artesanal e informal, Rev. Inst. Adolfo Lutz. 73, 364–367.

<https://doi.org/10.18241/0073-98552014731628>.

Babudieri, B., Moscovici, C., 1950. Behaviour of *Coxiella burnetii* with physical and chemical treatment, Rend Inst Sup Di Sanità J. 13, 739–748.

Barandika, JF, Alvez-Alonso, R., Jado, I., Hurtado, A., Garcia-Pérez, AL, 2019. Viable *Coxiella burnetii* in hard cheeses made with unpasteurized milk, Int. J. of Food Microbiol. 303, 42-45. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019>.

Birkenheuer, AJ, Levy, MG, Breitschwerdt, EB, 2003. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples, J. Clin. Microbiol. 41, 4172–4177. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.9.4172-4177.2003>.

BRASIL, MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). Portaria IMA Nº 1736 DE 27/07/2017. Dispõe sobre o período de maturação do Queijo Minas Artesanal de Minas Gerais. Diário do Executivo, em 28 jul 2017. Disponível: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=346814>. Acesso em: 13/02/2020.

BRASIL, MINAS GERAIS. Lei nº 23157, de 18 de dezembro de 2018. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos Artesanais de Minas Gerais. Diário do Executivo, em 19 dez 2018. Disponível: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=372516>. Acesso em: 10/03/2020.

BRASIL, Instituto Brasileiro Geografia Estatísticas (IBGE), Portal do IBGE. Disponível: <https://www.ibge.gov.br>, Acesso: 22/Maio/2020.

Bustin, SA, Benes, V., Garson, JA, Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, MW, Shipley, GL, Vandesompele, J., Wittwer, C., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments, *Clinical Chem.* 55, 611–622. <http://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.

Capuano, F., Mancusi, A., Casalnuovo, F., Perugini, A., Proroga, Y., Guarino, A., M. Berri, M., 2012. Real-time PCR-based detection of *Coxiella burnetii* in cheeses, *Eur. Food Res. Technol.* 235, 181–186. <http://doi.org/10.1007/s00217-012-1855-z>.

[Centers for Disease Control and Prevention](#), [National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases \(NCEZID\)](#), [Division of Vector-Borne Diseases \(DVBD\)](#)
age last reviewed: January 15, 2020.
<https://www.cdc.gov/qfever/transmission/index.html>.

Duron, O., Jourdainb, E., McCoya, KD, 2014. Diversity and global distribution of the *Coxiella* intracellular bacterium in seabird ticks, *Ticks and Tick-borne Dis.* 5, 557–563. <http://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.003>.

Eldin, C., Angelakis, E., Renvoisé, A., Raoult, D., 2013. *Coxiella burnetii* DNA, but not viable bacteria, in dairy products in France, *The Am. J. Trop. Med. and Hyg.* 88,

765–769. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0212>.

Enright, JB, Sadler, WW, Thomas, RC, 1957. Thermal inactivation of *Coxiella burnetii* and its relation to pasteurization of milk, Public Health Monogr. 47, 1–30. <http://doi.org/10.2105/AJPH.47.6.695>.

Eraso-Cadena, MP, Molina-Guzmán, LP, Cardona, X, Cardona-Arias, JA, Ríos-Osorio, LA, Gutierrez-Builes, LA, 2018. Serological evidence of exposure to some zoonotic microorganisms in cattle and humans with occupational exposure to livestock in Antioquia, Colombia. Cad. Saúde Pública. 34, e00193617. <http://doi.org/10.1590/0102-311X00193617>.

European Food Safety Authority. Scientific opinion on Q fever. EFSA J. 8 (2010). <http://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1595>.

Ewing, CA, Rumsey, DH, Lanqberg, AF, Sandler, SG, 1998. Immuno prophylaxis using intravenous Rh immune globulin should be standard practice when selected D-negative patients are transfused with D-positive Randon donor platelets, Immunohematology. 14, 133–137.

Ferreira, AGG, Lyra, DG, Silva, JCS, Soares, FMF, Araújo, CA, 2017. Perfil dos consumidores de leite bovino in natura no município de Santana do Ipanema – Alagoas, Nutritime Revista Eletrônica 14, 6056–6065.

Fishbein, DB, Raoult, D., 1992. A cluster of *Coxiella burnetii* infections associated with exposure to vaccinated goats and their unpasteurized dairy products, Am. J. Trop. Med. Hyg. 47, 35–40. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.1992.47.35>.

Gale, P., Kelly, L., Mearns, R., DugganJ., Snary, EL, 2015. Q fever through consumption of unpasteurised milk and milk products – a risk profile and exposure assessment, J. Appl. Microbiol. 118, 1083–95. <http://doi.org/10.1111/jam.12778>.

Galiero, A., Fratini, F., Cammà, C., Domenico, MD, Curini, V., Baronti, I., Turchi, B., Cerri, D., 2016. Occurrence of *Coxiella burnetii* in goat and ewe unpasteurized cheeses: screening and genotyping. Int. J. Food Microbiol. 237, 47-54. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.008>.

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 Microbiol. 6, 2. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-6-2>.

Langoni, H., Penachio, DS, Citadella, JCC, Laurino, F., Faccioli-Martins, PY, Lucheis, SB, Menozzi, BD, Silva, AV, 2011. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino, Pesq. Vet. Bras. 31, 1059–1065. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2011001200004>.

Loftis, AD, Priestley, RA, Massung, RF, 2010. Detection of *Coxiella burnetii* in commercially available raw milk from the United States, Food Borne Pathog. and Dis.

7, 1453–1456. <http://doi.org/10.1089/fpd.2010.0579>.

Mioni, MRS, Ribeiro, BLD, Peres, MG, Teixeira, WSR, Pelícia, VC, Motta, RG, Labruna, MB, Ribeiro, MG, Sidi-Boumedine, K., Megid, J., 2019a. Real-time quantitative PCR- based detection of *Coxiella burnetii* in unpasteurized cow's milk sold for human consumption, Zoonoses Public Health. 0, 1–6. <http://dx.doi.org/10.1111/zph.12609>.

Pieri, FA, Colombo, M., Merhi, CM, Juliati, VA, Ferreira, MS, Nero, MA, Nero, LA, 2014. Risky consumption habits and safety of fluid milk available in retail sales outlets in Viçosa, Minas Gerais State, Brazil, Foodborne Pathog. and Dis. 11, 490–496. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1712>.

Raymundo, NKL, Bersot, LS, Osaki, SC, 2017. Consumer profile and problems associated with uninspected raw milk consumption in western Paraná. Arq. Inst. Biol. 84, e0872016. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000872016FOOD>.

Rozental, T., Faria, LSF, Silva, MR, Forneas, D., Guterres, A., Ribeiro, JB, Araújo, FR, Lemos, ERS, 2020. Firsrt molecular detection of *Coxiella burnetii* in Brazilian artesanal cheese: a neglected food safety hazard in ready-to-eat raw-milk product *Coxiella burnetii* in raw-milk cheese, Braz. J. Infect. Dis. 24, 208–212. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.05.003>.

Sanger, F., Niklen, S., Coulson, AR, 1977. DNA sequencing with chain termination

inhibitors. Proc. Nat. Acad. Sci. 74, 5463–5467.

<http://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.

Sings, KA, Stobierski, MG, Gandhi, TN, 2012. Q fever cluster among raw milk drinkers in Michigan, 2011, Clin. Infect. Dis. 55, 1387–1389.

<http://doi.org/10.1093/cid/cis690>.

Thrusfield, MV, 2005. Veterinary Epidemiology, third ed., Blackwell Science, Oxford.

Tissot-Dupont, H., Raoult, D, 2008. Q fever, Infect. Dis. Clin. of North Am. 22, 505–514.

Vidal-Martins, AMC, Bürger, KP, Gonçalves, ACS, Grisólio, APR, Aguilar, CEG, Rossi, GAM, 2013. Avaliação do consumo de leite e produtos lácteos informais e do conhecimento da população sobre os seus agravos à Saúde Pública, em um município do estado de São Paulo, Brasil, B. Indústr. Anim. 70, 221–227.

<https://doi.org/10.17523/bia.v70n3p221>.

Capítulo 3- Considerações Finais

A febre Q, zoonose causada pela bactéria *C. burnetii*, é um exemplo clássico da importância da colaboração funcional e sustentável na interface ser humano, animal e ambiente. Deve-se aplicar o conceito de Saúde Única para entender a dinâmica da infecção e, assim, evitar ameaças à saúde pública (doença no ser humano), à saúde animal (doença no gado de leite, levando à perda de produção e, conseqüentemente, problemas econômicos) e à saúde ambiental (reservatórios selvagens). Por isso, é necessário entender a dinâmica da infecção, a fim de mitigar ameaças de doenças à saúde pública, economia de gado e vida selvagem (Cleveland et al., 2001).

A capacidade de *C. burnetii* infectar múltiplos hospedeiros como animais selvagens, domésticos, artrópodes e os humanos foi considerado um dos principais fatores de risco dessa bactéria. É uma zoonose que possui meios de transmissão dessa infecção para os humanos, como a exposição ocupacional na lida com os rebanhos ou em laboratórios que trabalham com essa bactéria, pelo consumo de leite cru e/ou produtos lácteos produzidos com leite *in natura* e pela inalação de aerossóis contaminados de secreções e excreções de animais infectados liberados no ambiente (Oyston; Davies, 2011)

Os resultados deste estudo apontam para a importância de incluir esta doença nos programas de vigilância em saúde animal e pública, bem como na lista de doenças de notificação obrigatória em humanos no Brasil. A criação de programas de vigilância e monitoramento da fauna silvestre, o controle sanitário dos rebanhos, adoção de boas práticas de fabricação do queijo Minas Artesanal visando a qualidade e a segurança alimentar, criação de programas de apoio e treinamentos para os produtores, bem como incentivo para regularização dos produtos para diminuir a venda informal de produtos lácteos ações de fiscalização nos comércios com intuito de diminuir a venda clandestina de produtos, conscientização da população quanto aos risco do consumo de produtos informais, principalmente do queijo Minas Artesanal fabricado de leite *in natura* torna-se uma das principais formas de contensão da doença para os humanos.

Os animais silvestres representa a maior fonte de infecção para os animais domésticos, principalmente dos destinados a produção (Angelakis; Raoult, 2010).

Com isso, torna-se fundamental a adoção de estudos ecoepidemiológicos na região para melhor compreensão e mapeamento da infecção nos animais silvestres.

Medidas como o controle de carrapatos, e higiene constante dos locais de ordenha, adoção de práticas de antissepsia, testagem do rebanho e incineração de materiais de alto risco como os produtos de aborto; além do tratamento do estrume com cal ou cianeto de cálcio antes do espalhamento sobre o campo, contribuem para uma maior sanidade do rebanho (Schimmer et al. 2012).

Trabalhadores como os que lidam com o gado, produtores, médicos veterinários, funcionários de frigoríficos e os que trabalham com esse patógeno em laboratórios precisam de uma atenção especial, pois estão mais expostos ao agente infeccioso e a utilização de equipamentos de proteção coletiva e individual podem auxiliar na prevenção de infecção de *C. burnetii* na área ocupacional.

O Queijo Minas Artesanal é um dos queijos mais produzidos e consumidos no Brasil, principalmente, em Minas Gerais. A produção desses queijos garante a renda de muitas famílias, o que gera um estímulo da economia local, porém torna-se fundamental a produção com qualidade e segurança alimentar.

A Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Estado de Minas Gerais, por meio das EMATERs (Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural) desenvolveram um Guia Técnico para implementações de Boas Práticas de Fabricação em Unidades de Produção do Queijo Minas Artesanal com intuito de esclarecer a importância que essas medidas de fabricação não trarão apenas encargos, mas poderão proporcionar uma maior valorização do produto frente ao mercado consumidor, que contará com uma melhor imagem e segurança. As EMATERs também possuem programas de apoio e capacitação para os produtores desse tipo de produto, porém muitos dos pequenos produtores não desfrutam desses serviços, por não conhecer os programas ou mesmo por falta de acessibilidade (Minas Gerais, 2009).

Novas pesquisas em diversas espécies, principalmente, nos rebanhos leiteiros, são necesserários para se estabelecer as atividades para controle e prevenção da febre Q no Município, uma vez que foi demonstrado a circulação desse patógeno ao ser detectado o DNA da bactéria inclusive em alimentos prontos para consumo humano.

SAÚDE ÚNICA:

- ✓ monitorar e avaliar a função e o impacto dessas atividades
- ✓ melhor uso de recursos limitados - reduz as perdas indiretas da sociedade, como impactos na subsistência de pequenos produtores, má nutrição e restrição do comércio e do turismo
- ✓ trabalhar de forma colaborativa entre setores e disciplinas, vidas humanas e animais são salvas, a subsistência é garantida e nossos sistemas de saúde globais são melhorados de maneira sustentável.
- ✓ novos desafios de saúde surgem na interface homem-animal-ambiente. Para enfrentar essas ameaças, são necessárias colaboração, coordenação, comunicação e ação conjunta entre diferentes setores,

Referências

Allen T, Murray KA, Zambrana-Torrel C, Morse SS, Rondinini C, Marco MD, Breit N, Olival KJ, Daszak P (2017) Global hotspots and correlates of emerging zoonotic diseases. **Nature Communications** 8:1124.

Angelakis E, Raoult D (2010) Review Q fever. **Veterinary Microbiology** 140:297-309.

Cleaveland S, Laurenson MK, Taylor LH (2001) Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence **Center for Tropical Veterinary Medicine** 356:991-999.

BRASÍLIA, Ministério da Saúde, **Guia de Vigilância em Saúde**. Vol. Único (2019) 3ª Edição.

BRASÍLIA, Ministério da Saúde, **Manual de Vigilância, Prevenção e Controle de Zoonoses**, Normas Técnicas e Operacionais (2016)

MINAS GERAIS. **Guia Técnico para implementações de Boas Práticas de Fabricação em Unidades de Produção do Queijo Minas Artesanal**.

EMATER,2009.

Oyston PCF, Davies C. Q fever: the neglected biothreat agent. **J Med Microbiol** 2011; 60(1):9-21

Schimmer B, Lenferink A, Schneeberger P, Aangenend H, Vellema P, Hautvast J, Van Duynhoven Y. Seroprevalence and Risk Factors for *Coxiella burnetii* (Q Fever) Seropositivity in Dairy Goat Farmers' Households in The Netherlands, 2009-2010. **PLoS One** 2012; 7(7):1-10

Apendice (A) Roteiro de entrevista para diagnóstico de situação do consumo de produtos lácteos no Município de Patos de Minas-MG

Estabelecimento _____ Data: ____/____/____

1) Sexo: Masculino () Feminino ()

2) Idade em anos completos: _____ anos

3) Você costuma consumir leite e/ou derivados lácteos? () Sim () Não

Se não? Por quê? _____

4) Em caso positivo, quais e com qual frequência?

PRODUTO	MAIS DE 1 VEZ/ DIA	DIARIA	SEMANAL	EVENTUALMENTE	NÃO CONSOME
LEITE					
QUEIJO MINAS FRESCO					
QUEIJO MINAS CURADO					
QUEIJO MUSSARELA					
COALHADA					
IOGURTE					
MANTEIGA					

5) Onde você costuma comprar esses produtos?

() supermercado () feira () vendedor ambulante () padaria () Mercado municipal
() outros _____

6) Você costuma comprar produtos direto do produtor?

() Sim () Não

Se sim quais produtos? _____

7) Caso compre leite cru qual seu procedimento?

() consome cru () Ferve o leite

8) Quando você compra produtos lácteos, você observa se a embalagem tem algum carimbo?

() Sim () Não

9) Você conhece as siglas

SIF () Sim () Não

SISP () Sim () Não

SIM () Sim () Não

10) Você sabe o que as siglas dos carimbos indicam?

() Sim () Não

Se Sim, o que elas indicam? _____

11) Na sua opinião, o consumo de leite e de produtos lácteos pode causar doenças?

() Sim () Não

Se sim, você conhece alguma? _____

12) Você ou alguém da sua casa já ficou doente após consumir algum produto lácteo?

() Sim () Não

13) Quais manifestações clínicas apresentaram?

() dor de barriga

() dor de cabeça

() vômito

() diarreia

() febre

() Outros _____

14) Renda familiar () < 1 salário mínimo

() de 1 a 2 salários

() de 2 a 3 salários

() de 3 a 4 salários

() de 4 a 5 salários

() > 5 salários

15) Qual o grau de escolaridade?

() analfabeto

() fundamental incompleto

() fundamental completo

() médio incompleto

() médio completo

() superior incompleto

() superior completo

() pós-graduado

16) Qual bairro você mora? _____

17) Quantas pessoas moram na sua casa? _____
