

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CAMPUS DE BOTUCATU

SOROLOGIA E DETECÇÃO MOLECULAR DE *Coxiella burnetii* EM
BOVINOS NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL.

MATEUS DE SOUZA RIBEIRO MIONI

BOTUCATU, SÃO PAULO

Dezembro / 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CAMPUS DE BOTUCATU

SOROLOGIA E DETECÇÃO MOLECULAR DE *Coxiella burnetii* EM
BOVINOS NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL.

MATEUS DE SOUZA RIBEIRO MIONI

Tese de doutorado apresentada junto ao programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu (FMVZ – UNESP), para obtenção do título de doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Jane Megid

BOTUCATU

Dezembro / 2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM. DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Mioni, Mateus de Souza Ribeiro.

Sorologia e detecção molecular de *Coxiella burnetii* em bovinos no estado de São Paulo, Brasil. / Mateus de Souza Ribeiro Mioni. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: Jane Megid
Capes: 50502000

1. Febre Q. 2. Saúde pública. 3. *Coxiella burnetii*. 4. Aborto.

Palavras-chave: Abortamento; *Coxiella burnetii*; Febre Q; Saúde Pública.

MATEUS DE SOUZA RIBEIRO MIONI

SOROLOGIA E DETECÇÃO DE *Coxiella burnetii* EM BOVINOS NO
ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Titular Dra. Jane Megid

Orientadora

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública - FMVZ/UNESP - Botucatu - SP.

Prof. Titular Hélio Langoni

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública - FMVZ/UNESP - Botucatu - SP.

Prof. Dr. Francisco Borges Costa

Membro

Departamento de Patologia - UEMA – São Luís - MA.

Dr. Karim Sidi-Boumedine

Membro

ANSES, Sophia-Antípolis, França.

Prof. Dr. Ricardo Seiti Yamatogi

Membro

Departamento de Medicina Veterinária - UFV - Viçosa - MG.

Data da defesa de doutorado: 20 de Dezembro de 2018.

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais, José Carlos e Eliana, por toda alegria e sabedoria transmitida ao longo de minha vida.

Aos meus avós Wagner e Dionê, que presenciaram o início desta etapa que estou concluindo, mas que infelizmente não puderam estar comigo até o final. Muita saudade.

À minha avó, Bernadete, velinha porreta, sempre feliz e cozinheira de mão cheia.

À minha esposa, Keila, minha companheira, minha eterna namorada. Obrigado por me ajudar em todos os momentos. Te amo!

À Jane Megid, minha orientadora, minha amiga. Obrigado por resgatar meu gosto pelas ciências.

AGRADECIMENTOS

Ao fiscal federal agropecuário Dr. Jean Guilherme Fernandes Joaquim, e a fiscal federal agropecuária, Dra. Anne Stachissini, pela essencial ajuda para o trabalho. E a todos os fiscais do Serviço de Inspeção Federal (SIF) que colaboraram com este estudo.

À Coordenadoria de Defesa Agropecuária (CDA) do Estado de São Paulo, pela colaboração com as coletas realizadas nos abatedouros regionais.

Ao médico veterinário Márcio Luiz Félix, do Escritório de Defesa Agropecuária (EDA) de Jaú, e aos médicos veterinários Guilherme Shin Iwamoto Haga e Francisco Pereira Neto, do EDA de Botucatu, por toda ajuda fornecida.

Aos diretores e proprietários de todos os estabelecimentos que colaboraram para a realização do projeto.

Ao professor Dr. Márcio Garcia Ribeiro, que muito acrescentou para a elaboração desta dissertação.

Ao professor Dr. Marcelo Bahia Labruna, pelo suporte laboratorial e por sua disponibilidade.

A todos os funcionários do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ/UNESP, câmpus de Botucatu.

Ao Dr. Karim Sidi-Boumedine, Dra. Élodie Rousset e a todos os colegas da Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) que foram muito receptivos e acrescentaram muito na minha formação profissional e pessoal.

Aos meus colegas de laboratório, Clóvis, Vanessa, Wanderson, Bruna, Marina, Acácia, Camila, pela boa convivência e pela ajuda durante esta fase.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa (Processo 88887.137563/2017-00) para a realização do doutorado sanduíche.

E a todos que de alguma maneira contribuíram, mesmo que silenciosamente e a distância, para que esta obra se concretizasse.

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1. Representação esquemática dos possíveis resultados da infecção do útero por <i>Coxiella burnetii</i> em animais.....	11
--	----

LISTA DE FIGURAS EM INGLÊS:

Figure 2. Distribution of serum samples by municipalities.....	41
Figure 3. Distribution of seropositive animals in imunofluorescence assay (IFA).....	41
Figure 4. Detection of <i>Coxiella burnetii</i> DNA in different municipalities.....	42
Figure 5. Minimum spanning tree of <i>Coxiella burnetii</i> using all mlva loci.....	73
Figure 6. Minimum spanning tree of <i>Coxiella burnetii</i> using only genotyped loci...	73

LISTA DE QUADROS:

Quadro1. Aplicações dos métodos diagnóstico de coxielose. Adaptado de (OIE, 2018).....	24
--	----

LISTA DE TABELAS:

Table 1. Apparent prevalence and true prevalence considering the sensibility and specificity for ifa and qpcr with a 95% confidence interval.	39
Table 2. Prevalence for each slaughterhouse evaluated during the study by IFA and qPCR.	40
Table 3. Quantification through real-time PCR of <i>Coxiella burnetii</i> in the aborted fetus from cattle.	63
Table 4. Results of <i>Coxiella burnetii</i> analysis based on the Multilocus Variable Tandem Repeat Analysis (MLVA).	72
Table 5. Results of <i>Coxiella burnetii</i> genotyping based on Multispacers Typing Sequencing (MST).	72

LISTA DE ABREVIACÕES:

APMD: Aborto, parto prematuro, natimorto, descendente fraco.

CDC: Center for Diseases Control.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

ELISA: Ensaio imuno-enzimático.

EUA: Estados Unidos da América.

LCV: variante de células grandes.

LPS: Lipopolissacarideo.

MLVA: Análise de multilocus de repetições em tandem de número variável.

MST: Multispacer Sequence Typing.

OIE: Organização Mundial de Saúde Animal.

PCR: Reação em cadeia da polimerase.

pH: potencial hidrogeniônico.

PIB: Produto interno bruto.

qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real.

RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta.

RNA: Ácido ribonucleico.

SCV: variante de células pequenas.

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo Único

TFC: Teste de fixação de complemento

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....	3
CAPÍTULO 2 – REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 – Histórico.....	5
2.2 – Características da bactéria	6
2.3 – Características da infecção	8
2.4 – A enfermidade nos animais.....	10
2.5 – A enfermidade em humanos	14
2.6 – Epidemiologia	16
2.7 – Febre Q / Coxielose no Brasil	19
2.8 – Métodos de diagnóstico	24
2.8.1 – Sorologia	25
2.8.2 – Isolamento.....	27
2.8.3 – Diagnóstico Molecular	28
2.9 – Genotipagem	29
CAPÍTULO 3 – PREVALENCE OF <i>Coxiella burnetii</i> SLAUGHTERHOUSES AND IMPLICATION FOR PUBLIC HEALTH.	31
CAPÍTULO 4 – FIRST REPORT OF <i>Coxiella burnetii</i> IN THE ABORTED FETUSES FROM CATTLE IN BRAZIL.	54
CAPÍTULO 5 – NEW GENOTYPES OF <i>Coxiella burnetii</i> CIRCULATING IN SOUTH AMERICA.....	64
CAPÍTULO 6 – DISCUSSÃO GERAL.....	74
CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES GERAIS	80
BIBLIOGRAFIA	81

MIONI, M.S.R. **SOROLOGIA E DETECÇÃO DE *Coxiella burnetii* EM BOVINOS NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL.** Botucatu, 2018. 101p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Coxiella burnetii é uma bactéria intracelular obrigatória responsável por causar a febre Q em humanos, mas também é conhecida como coxielose em animais. No Brasil, pouco é sabido a respeito da epidemiologia da enfermidade. O presente estudo objetiva estabelecer a prevalência do patógeno em bovinos abatidos no estado de São Paulo, além da detecção molecular em soro e fetos de bovinos. A sorologia de 1515 amostras de bovinos coletadas em frigoríficos foi realizada por reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para anticorpos anti-*C. burnetii*. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) visando detectar o gene *IS1111*, foi utilizada para o diagnóstico molecular de *C. burnetii* em amostras de soro e fetos de bovinos. A prevalência aparente para anticorpos anti-*C. burnetii* em bovinos foi de 23,8% [IC95%=21,7% – 25,9%] (n=360), e a prevalência real de 20,0% [IC95%=17,8 – 22,3%]. A qPCR foi realizada nas 360 amostras soropositivas e apresentou resultado positivo em 92 amostras (25,6% [IC95%=20,1% – 28,8%]), demonstrando a presença do micro-organismo na corrente sanguínea dos bovinos amostrados. Entre as 28 amostras de fetos bovinos analisados, 10,7% (n=3) foram positivas na qPCR, confirmado por sequenciamento. A análise por qPCR quantitativo das amostras de abortamentos indicaram concentração entre 500 – 10⁴ células por grama de tecido. Análise de multilocus de repetições em tandem de número variável (MLVA) e Multispacer Sequence Typing (MST) das amostras de fetos e do controle positivo revelaram novas estirpes de *C. burnetii* circulando no Brasil e na Argentina. Os resultados aqui apresentados evidenciam a circulação da bactéria alertando para o risco para saúde pública.

MIONI, M.S.R. **SEROLOGY AND MOLECULAR DETECTION OF *Coxiella burnetii* IN CATTLE FROM STATE OF SÃO PAULO, BRAZIL.** Botucatu, 2018. 101p. Thesis (Doctorate) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Coxiella burnetii is an obligate intracellular bacterium responsible for causing Q fever in humans but is also known as coxiellosis in animals. In Brazil, little is known about the epidemiology of the disease. The present study aims to establish the prevalence of the pathogen in cattle slaughtered in the state of São Paulo, in addition to molecular detection in bovine serum and fetuses. The serology of 1515 bovine samples collected in slaughterhouses was performed by indirect immunofluorescence reaction (IFA) for anti-*C. burnetii* antibodies. Real-time polymerase chain reaction (qPCR) to detect the IS1111 gene was used for the molecular diagnosis of *C. burnetii* in bovine serum and fetal samples. The apparent prevalence of anti-*C. burnetii* antibodies in cattle was 23.8% [95% CI = 21.7% - 25.9%] (n = 360) and the true prevalence was 20.0% [95% = 17.8 - 22.3%]. The qPCR was performed in the 360 seropositive samples and presented a positive result in 92 samples (25.6% [95% CI = 20.1% - 28.8%]), demonstrating the presence of the microorganism in the blood stream of the sampled cattle. Among the 28 samples of bovine fetuses analyzed, 10.7% (n = 3) were positive in qPCR, confirmed by sequencing. Quantitative qPCR analysis of the abortion samples indicated concentration between 500-10⁴ cells per gram of tissue. Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA) and Multispacer Sequence Typing (MST) from fetal samples and positive control revealed new strains of *C. burnetii* circulating in Brazil and Argentina. The results presented here evidenced the circulation of the bacterium alerting to the risk to public health.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

O setor agropecuário brasileiro possui grande importância na balança comercial do nosso país apresentando uma participação de 21% do PIB nacional, do qual 30% correspondem ao setor pecuário (ABIEC, 2016).

Diversas enfermidades podem acometer bovinos, acarretando em perdas econômicas decorrente da morte de animais, diminuição da produção de carne, leite, e subprodutos derivados, e perdas relacionadas a recursos humanos, uma vez que entre os possíveis patógenos capazes de infectar bovinos, quarenta e cinco deles são agentes de zoonoses (TAYLOR et al., 2001; WOOLHOUSE e GOWTAGE-SEQUERIA, 2005). Quando a interface animal-humano é rompida, podem ocorrer problemas como afastamentos do trabalho, aposentadorias por invalidez e por vezes até a morte dos acometidos. Além disto, a possibilidade de manutenção da infecção entre a população humana e animal gera um problema importante de saúde pública (LLOYD-SMITH et al., 2013; MCDANIEL et al., 2014).

A saúde do rebanho é de suma importância para a manutenção da produtividade e lucratividade da pecuária e, para isso, uma série de medidas é necessária como, o controle de doenças baseado em programas oficiais de controle e erradicação, a consultoria de veterinários privados, o uso de vacinas e estudos epidemiológicos para a orientação de ações de medidas preventivas.

Coxiella burnetii é uma bactéria intracelular obrigatória, capaz de infectar uma vasta gama de animais. A doença é conhecida como Febre Q, em humanos, e como coxielose nos animais. Os ruminantes domésticos são considerados as principais fontes de infecção, com bovinos, caprinos e ovinos, responsabilizados por surtos zoonóticos em diversos países (MAURIN e RAOULT, 1999; GEORGIEV et al., 2013; OIE, 2018). Apesar da característica essencialmente assintomática da enfermidade, algumas complicações importantes podem ocorrer após a infecção aguda ou crônica, como pneumonia atípica, hepatite, endocardite e abortamentos, em humanos, e distúrbios de ordem reprodutiva em bovinos, caprinos e ovinos (RAOULT, 2012; OIE, 2018).

No Brasil, são praticamente incipientes os dados oficiais sobre a situação da Febre Q, uma vez que *C. burnetii* era reconhecida como exótica no território nacional. Entretanto, recentes casos da enfermidade humana, nos quais animais foram incriminados como possíveis fontes de infecção, foram relatados nos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, demonstrando o caráter emergente da doença, semelhante ao que ocorre em diversos países do mundo (COSTA et al., 2006; MARES-GUIA, 2015; DE OLIVEIRA et al., 2018; LEMOS et al., 2018), demonstrando a necessidade de maiores informações sobre aspectos epidemiológicos da doença no Brasil, com foco especial aos reservatórios.

Desta forma, o presente estudo investigou a ocorrência de *C. burnetii* em bovinos, caprinos e ovinos do estado de São Paulo, em animais enviados para o abate, em fetos abortados e em esfregaços vaginais.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Histórico

Em 1935, um surto de uma doença febril que acometeu 20 trabalhadores de um abatedouro da cidade de Brisbane, Austrália, foi investigado primeiramente pelo Dr. Derrick que a designou “*Query fever*” (Febre Q), onde query tem o significado de questão, interrogação, dúvida, uma vez que não se sabia qual era o agente causador da enfermidade (GÜRTLER et al., 2014; MARRIE et al., 2015). Derrick inoculou cobaias com sangue e urina dos pacientes acometidos durante o surto e os animais passaram a apresentar febre. Incapaz de isolar o agente causador, o pesquisador enviou uma alíquota da emulsão salina do fígado das cobaias acometidas para Melbourne, onde os pesquisadores Burnet e Freeman, isolaram o agente causador da Febre Q caracterizando-a como *Rickettsia burnetii* (*R. burnetii*) (MARRIE, 1990; MARRIE e RAOULT, 1997).

Concomitantemente nos Estados Unidos da América (E.U.A.), os pesquisadores Davis, Cox e Dyer trabalhavam com os possíveis vetores de transmissão da Febre das Montanhas Rochosas e tularemia. O grupo americano possuía carrapatos provenientes da região de “Nine Mile Creek”, no estado de Montana, que se alimentavam de cobaias para propósito de pesquisa, e observaram que os animais adoeceram. A partir dos carrapatos, foi isolado o agente patogênico que foi nomeado por Cox como *R. diaporica* (MARRIE e RAOULT, 1997).

Em 1938, dez dias após uma visita a Cox em Montana, Rolla Dyer, diretor do “National Institute of Health”, adoeceu apresentando febre, dor retro orbital, calafrios e sudorese. Cobaias inoculadas com cinco mililitros do sangue de Dyer se tornaram enfermas e, posteriormente, demonstrou se tratar da mesma bactéria que foi isolada dos carrapatos de “Nine Mile Creek” (MARRIE, 1990).

No ano de 1948, Cornelius B. Philip propôs que *R. burnetii* fosse considerada uma espécie de um gênero distinto uma vez que este micro-organismo diferia das demais rickettsias. Em homenagem aos grupos de pesquisadores que realizaram o isolamento da bactéria, o patógeno passou a ser conhecido como *Coxiella burnetii* (MARRIE, 1990; GÜRTLER et al., 2014; MARRIE et al., 2015).

2.2 – Características da bactéria

O agente responsável pela doença, *C. burnetii*, é um pequeno cocobacilo (0,4 a 1 µm de comprimento) pertencente à classe Gammaproteobactéria, ordem Legionellales, intracelular obrigatório, que possui parede celular semelhante a bactérias gram-negativas, mas que não se cora pelo método de Gram. A técnica de Gimenez é utilizada para corar *C. burnetii* isoladas em cultura ou em diferentes espécimes clínicos (GUATTEO et al., 2011; ELDIN et al., 2017).

O tempo de duplicação estimado da bactéria está entre 20h e 45h em cultura celular “in vitro” (ANGELAKIS e RAOULT, 2010). O vacúolo de replicação adquire progressivamente características semelhantes à fagolisossomos, tais como pH ácido, hidrolisados ácidos e peptídeos catiônicos. A bactéria participa ativamente da gênese deste vacúolo intracelular, apresentando estratégias diversas de adaptação a este ambiente. Inicialmente, *C. burnetii* codifica proteínas básicas que estão provavelmente envolvidas no tamponamento do ambiente ácido do fagolisossomo (SESHADRI et al., 2003). Além disso, quatro permutadores de próton sódio e transportadores de osmoprotetores são encontrados no genoma de *C. burnetii*, possibilitando que esta bactéria enfrente tensões osmóticas e oxidativas (ELDIN et al., 2017).

C. burnetii apresenta variação morfológica durante o ciclo de desenvolvimento, que possuem variável resistência ambiental (MARRIE et al., 2015). São observadas duas formas do micro-organismo, correspondendo a um ciclo de desenvolvimento bifásico. A variante de células grandes (LCV) da bactéria é uma forma de reprodução exponencial, enquanto que a variante de células pequenas (SCV) é uma forma estacionária não replicativa (TOMAN et al., 2012). As LCVs têm tamanho maior (>0,5 µm), cromatina não condensada e um envelope semelhante ao das bactérias gram-negativas clássicas, enquanto que as SCVs são pequenos bacilos (0,2 a 0,5µm de comprimento) caracterizados por cromatina condensada, um envelope espesso e um sistema de membrana interna incomum. Este tipo de apresentação celular geralmente é observada após cultura prolongada (21 dias) em células Vero e no meio axênico de citrato de cisteína acidificado 2 (ACCM2) (ELDIN et al., 2017). As SCVs são estáveis no ambiente e altamente

resistentes aos estresses osmóticos, mecânicos, químicos, térmicos e a dessecação, podendo sobreviver durante 7 a 10 meses em lã à temperatura ambiente, durante mais de 1 mês em carne fresca e durante mais de 40 meses em leite (ANGELAKIS e RAOULT, 2010). Embora as SCVs sejam destruídas por formaldeído a 2%, já foram isoladas de tecidos armazenados em formaldeído por 4 a 5 meses (ANGELAKIS e RAOULT, 2010). Estas propriedades acarretaram à adoção de temperatura elevada para pasteurização na década de 1950 (ENRIGHT et al., 1957). A análise de transcriptoma do SCV revelou maior expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo, remodelação da parede celular e aquisição de arginina (ELDIN et al., 2017). Além disso, as SCVs mostram número elevado de ligações cruzadas no peptidoglicano, que provavelmente está envolvido na sua elevada resistência ambiental (MARRIE et al., 2015; ELDIN et al., 2017).

O lipopolissacarídeo (LPS) é considerado um dos principais determinantes da expressão de virulência e infecção de *C. burnetii*. A bactéria possui duas variações do LPS de membrana, a saber: LPS da fase I virulenta (LPS I) e de fase II avirulenta (LPS II). O LPS II é de tipo rugoso, em contraste com o LPS I, que é fenotipicamente liso e contém dois açúcares, virenose e dihidrohidroxistreptose, que não foram encontrados em outros LPSs e podem ser considerados como biomarcadores únicos do patógeno (TOMAN et al., 2012). Ambos os açúcares estão localizados principalmente em posições terminais da cadeia “O” específica do LPS I (O-PS I) e possuem envolvimento na imunobiologia da febre Q (TOMAN et al., 2012).

A variação de fase antigênica está relacionada a deleções gênicas que levam a perda de açúcares que compõe o LPS, reduzindo o seu tamanho. O LPS II está inserido no LPS I e é imunodominante, dessa forma, anticorpos anti-fase II estão sempre presentes, independentemente da fase da doença (ROUSSET et al., 2012). Em humanos, a enfermidade apresenta estágios agudo e crônico que correspondem as duas fases antigênicas distintas na resposta humoral. Durante a infecção aguda, uma resposta de anticorpos ao antígeno da fase II de *C. burnetii* é predominante maior do que a resposta ao antígeno da fase I, enquanto que na infecção crônica está associada a título de imunoglobulina G (IgG) direcionada ao antígeno de fase I de forma crescente (ANDERSON et al., 2013). Em animais, onde não há a diferenciação de enfermidade aguda e crônica, antígenos de fase II são mais

adequados a estudos epidemiológicos devido a invariável presença de anticorpos anti-fase II (ROUSSET et al., 2012).

A alta virulência de *C. burnetii*, a possibilidade de formação de aerossóis e a estabilidade ambiental, levaram o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos a classificar esta bactéria como agente de ameaça biológica da categoria B (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC, 2009), pois a má utilização poderia causar significativa incapacidade e, possivelmente, consequências em longo prazo devido à infecção persistente na população.

2.3 – Características da infecção

A comparação da virulência das diferentes estirpes isoladas em modelos animais é difícil uma vez que nenhum dos modelos é capaz de mimetizar a doença observada em humanos. A patogenicidade e virulência de *C. burnetii* dependem da espécie animal infectada, da via de infecção, da estirpe de *C. burnetii* e do inóculo (STEIN et al., 2005; BEWLEY, 2013; MELENOTTE et al., 2016). Experimentos conduzidos por inoculação intraperitoneal apresentaram períodos de incubação curtos e infecção difusa, enquanto que a injeção intra-nasal e a utilização de vias aerógenas resultaram em lesões de órgãos após 7 dias e afetaram basicamente os pulmões, com baixa disseminação sistêmica da bactéria, sendo esta a forma de experimentação que melhor mimetiza a infecção humana (BAUMGÄRTNER et al., 1993; STEIN et al., 2000, 2005).

A virulência do patógeno depende da estirpe e inclui a capacidade de induzir sinais clínicos como febre, esplenomegalia e morte. Estudo comparativo da patogenicidade entre as cepas *Nine Mile* de fase I e *Priscilla* de fase I demonstrou que a primeira induz soroconversão e febre com aproximadamente 4 micro-organismos, enquanto a segunda necessita de 10^5 bactérias para a indução de febre, ambas pela via intraperitoneal (RUSSELL-LODRIGUE et al., 2009). Corroborando com estes dados, MOOS e HACKSTADT (1987) confrontaram a patogenicidade de oito diferentes estirpes de quatro grupos filogenéticos diferentes experimentalmente inoculados por aerossóis em cobaias, e a cepa *Priscilla* demonstrou maior atraso no desenvolvimento dos sinais clínicos, menor progressão

da doença e menor carga bacteriana no fígado dos animais, enquanto que a cepa Nine Mile apresentou maior potencial patogênico. Em um estudo com cepas de *C. burnetii* provenientes de epidemias, *French Guiana* e *Netherlands-like*, a cepa *Nine Mile* se mostrou menos patogênica que ambas. A resposta sorológica foi mais exacerbada nas estirpes *French Guiana* e *Netherlands-like*, e os camundongos infectados com a cepa *French Guiana* apresentaram sinais mais graves de infecção, com mais de 20% de perda de peso 28 dias pós-infecção (EDOUARD et al., 2014). Ademais, o peso do fígado e a carga bacteriana foram significativamente maiores e as lesões histológicas foram mais precoces em camundongos infectados, respectivamente, de modo decrescente, com *French Guiana*, *Netherlands-like* e *Nine Mile* (MELENOTTE et al., 2016). Estes estudos evidenciaram que as cepas originadas de surtos apresentaram maior virulência.

O sequenciamento do genoma de *C. burnetii* (Nine Mile RSA493) revelou diversos genes codificadores de adesão, invasão, desintoxicação e sistemas de secreção de proteínas (SESHADRI et al., 2003). Os genes que codificam proteínas de invasão são semelhantes aos envolvidos na reorganização do citoesqueleto e na absorção de *Legionella pneumophila* e *Escherichia coli* enteropatogênica pelas células hospedeiras. Esses genes provavelmente atuam em diferentes níveis de invasão, bem como na reorganização do citoesqueleto observadas durante a infecção celular por *C. burnetii*. Os genes de desintoxicação codificam superóxido dismutase, catalase e fosfatase ácida, enzimas que possibilitam que *C. burnetii* escape da atividade microbica de macrófagos, devido à desintoxicação de intermediários de oxigênio reativos produzidos pelas células hospedeiras (ELDIN et al., 2017).

A virulência de estirpes de *C. burnetii* esta relacionada ao comprimento do LPS. *C. burnetii* de fase I é isolada a partir de pacientes com febre Q, já a forma avirulenta, fase II, é obtida após várias passagens no cultivo “in vitro” de *C. burnetii* em culturas de células (MAURIN e RAOULT, 1999). A transição de fase I para fase II leva a uma alteração irreversível do LPS, com diminuição gradual no peso molecular até a forma rugosa do LPS, devido à deleção genômica (MAURIN e RAOULT, 1999). A principal diferença entre os LPSs de cepas virulentas e avirulentas de *C. burnetii* reside no açúcar do núcleo, onde o antígeno O é ausente no LPS das cepas avirulentas, e o LPS de cepas virulentas contém açúcares como virenose,

dihidroxistrepseose e galactosamina uronil- (1,6) –glucosamina, substâncias que estão ausentes nas cepas não patogênicas (TOMAN et al., 2012; MARRIE et al., 2015).

Todos os isolados de *C. burnetii* contêm plasmídeo replicante autônomo (QpH1, QpRS, QpDV e QpDG) ou possuem sequências semelhantes à plasmídeos que se integraram ao cromossomo (MARRIE et al., 2015). Foi proposta certa relação entre os tipos de plasmídeos e a virulência, no entanto esta hipótese foi descartada (TOMAN et al., 2012). Independentemente da correlação entre plasmídeo e a doença humana, a conservação de plasmídeos ou sequências de plasmídeos integrados em todos os isolados sugere adaptação e papel essencial destas sequências na biologia do gênero *Coxiella* (MARRIE et al., 2015). Reforçando esta ideia, os plasmídeos contêm genes que codificam substratos *Dot / Icm* T4SS que podem, potencialmente, modificar o meio celular do hospedeiro para favorecer a multiplicação e sobrevivência bacteriana (VOTH et al., 2011).

2.4 – A enfermidade nos animais

A coxielose acomete grande variedade de vertebrados e invertebrados, já tendo sido reportada em mamíferos como bovinos, ovinos, caprinos, cavalos, cães, suínos, camelos, búfalos, porco-espinho, pombos, ratos, cangurus e, também, infectando cobras e carrapatos, além de possuir capacidade de se reproduzir em protozoários como a ameba (MAURIN e RAOULT, 1999; MARRIE et al., 2015; ROZENTAL et al., 2017; OIE, 2018). A infecção por *C. burnetii* nos animais pode ter resultados diversos (Figura 1) como, por exemplo, broncopneumonia em cabras e febre em bovinos (MARRIE et al., 2015). Todavia, a maioria dos animais infectados pelo patógeno não exteriorizam sinais clínicos e podem servir como fontes assintomáticas de infecção (GUATTEO et al., 2011; OIE, 2018).

A vida selvagem pode se constituir como reservatório para a infecção humana. Tal fato é descrito na literatura pelo relato de caso de febre Q aguda em pessoas após o contato com cangurus e wallabies na Austrália (STEVENSON et al., 2015), pelo envolvimento da preguiça de três dedos em Caiena, na Guiana Francesa, (DAVOUST et al., 2014) e pela presença do patógeno em animais silvestres da mata atlântica (ROZENTAL et al., 2017). Contudo, o principal reservatório para humanos

são os ruminantes, principalmente bovinos, caprinos e ovinos. Nos ruminantes domésticos, a coxielose comumente está associada a abortamentos esporádicos ou a surtos de abortamentos, além de poder resultar em morte de bezerros ou no nascimento de bezerros fracos (OIE, 2018). Ademais, a infecção por *C. burnetii* é também correlacionada com infertilidade, metrite, placentite e mastite subclínica em bovinos (BILDFELL et al., 2000; BARLOW et al., 2008; OIE, 2018). Durante o parto ou aborto, ocorre multiplicação de *C. burnetii* na placenta com consequente disseminação para o ambiente da ordem de 10^9 doses infectantes para cobaia por grama de tecido (GUATTEO et al., 2011; GUATTEO et al., 2012; MARRIE et al., 2015).

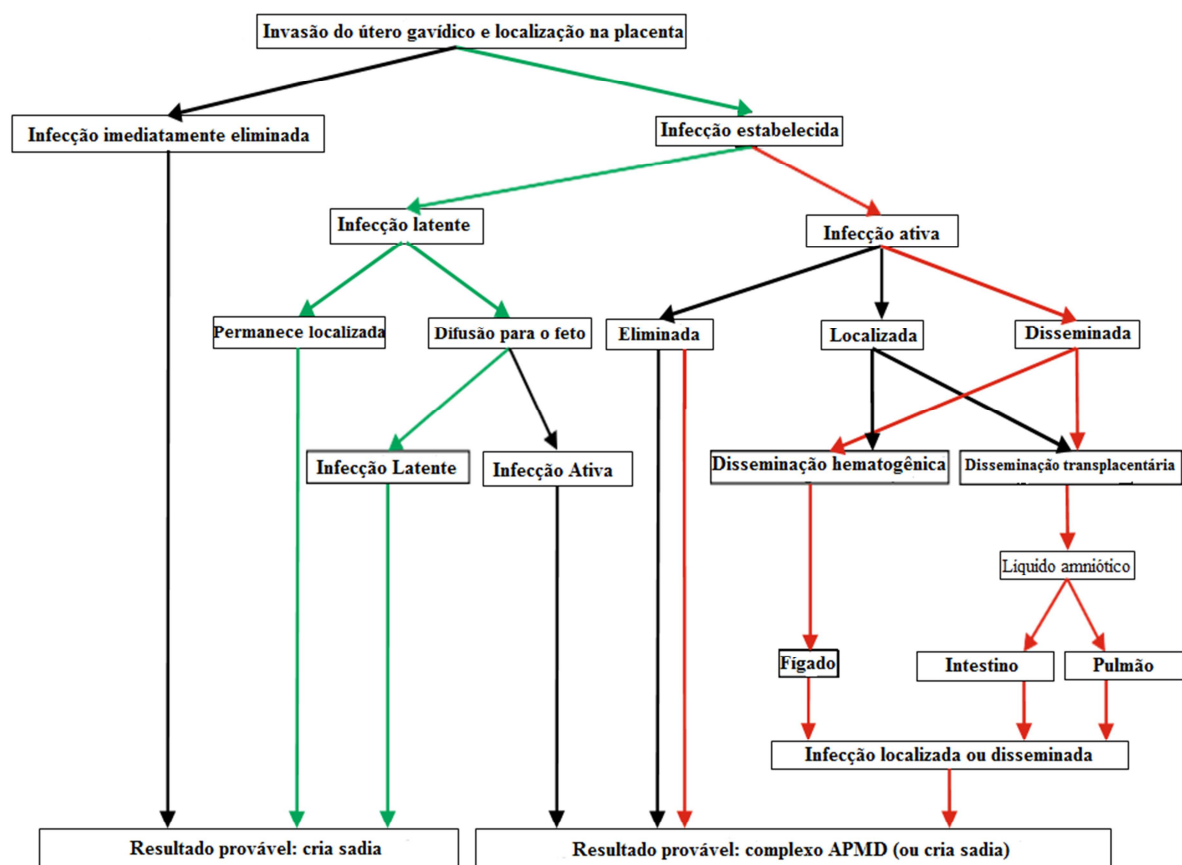


Figura 1. Representação esquemática dos possíveis resultados da infecção do útero por *Coxiella burnetii* em animais.

Legenda: APMD – aborto, parto prematuro, natimorto, descendente fraco. Fonte: Adaptado de AGERHOLM (2013).

C. burnetii pode ser eliminada durante muito tempo no leite e a duração da disseminação pode ser influenciada pela presença de mastite subclínica em vacas (BARLOW et al., 2008). RODOLAKIS et al. (2007) compararam a eliminação de *C. burnetii* em rebanhos bovinos, caprinos e ovinos da França. As vacas se apresentaram, em sua maioria, assintomáticas e disseminaram *C. burnetii* principalmente em leite e, em menor frequência (5%), o micro-organismo também foi encontrado em muco vaginal. Os rebanhos de ovelhas foram os mais infectados e apresentaram disseminação persistente por 2 meses com eliminação da bactéria em fezes, muco vaginal e leite. As cabras avaliadas disseminaram *C. burnetii* principalmente no leite, mas alguns animais também excretaram via muco vaginal ou fezes (RODOLAKIS et al., 2007). Essas diferenças nas vias de excreção talvez possam explicar por que os focos humanos são mais frequentemente relacionados com pequenos ruminantes e não com rebanhos bovinos, o que foi observado na Holanda (ROEST et al., 2011b). Para fins de monitoramento, o teste de PCR do leite em tanque de conjunto é um método útil para detectar a disseminação de *C. burnetii* em fazendas (CAPUANO et al., 2012; CLAEYS et al., 2013; PIÑERO et al., 2014).

As medidas preventivas são fundamentais para o controle da febre Q e a vacinação é uma opção disponível em alguns países para diminuir as taxas de abortamento e propagação da infecção. A vacinação é eficaz na redução das taxas de abortamentos e da carga bacteriana eliminada em muco vaginal, fezes e leite em (ARRICAU-BOUVERY et al., 2005) e deve ser realizada em ruminantes não infectados antes da primeira gravidez (HOGERWERF et al., 2011), não sendo capaz de prevenir o abortamento quando os animais já se encontram infectados (GUATTEO et al., 2008; VAN DEN BROM et al., 2015). Além disso, devem ser tomadas medidas de higiene padrão para prevenir a disseminação de *C. burnetii* no meio ambiente e entre animais. As fêmeas parturientes infectadas devem ser isoladas do rebanho e as placentas e os fetos devem ser coletados e destruídos por incineração ou dispostas em aterro sanitário (VAN DEN BROM et al., 2015). Ademais, deve-se evitar o acúmulo de fezes em fazendas durante as estações com maior incidência de ventos para evitar ou diminuir a transmissão por aerossóis (ELDIN et al., 2017). Os animais exibidos em feiras também devem ser cuidadosamente triados. Na Alemanha, uma ovelha que pariu durante uma feira colaborou como fonte de infecção de um surto de febre Q envolvendo 299 pessoas

presentes no evento (PORTEN et al., 2006). Na cidade francesa de Briançon, a investigação de um foco relacionado a um matadouro apontou que a infecção humana foi resultado da transmissão aérea de resíduos contaminados de ovelhas, facilitada pelo vento causado por heliporto próximo ao local (ARMENGAUD et al., 1997; CARRIERI et al., 2002). Quando da impossibilidade de aplicação de medidas preventivas e na presença de muitos animais infectados, o abate sanitário dos rebanhos é alternativa de conduta. Tal procedimento foi realizado na Holanda para controlar a epidemia que acometeu mais de 4 mil pessoas entre 2007 a 2010, resultando no abate de 50 mil animais (ROEST et al., 2011b; VAN DEN BROM et al., 2015).

A principal forma de introdução de *C. burnetii* em uma propriedade é por aerossóis transportados pelo vento (NUSINOVICI et al., 2015) ou por admissão de animais infectados. A ação do vento na transmissão está relacionada com a velocidade da rajada e com a carga bacteriana na formação do aerossol (NUSINOVICI et al., 2015), levando-se em consideração que a dose de infecção por inalação é estipulada entre 1 a 10 bactérias. Dependendo do tamanho e do estado imune do rebanho, a propagação da bactéria pode levar a altas taxas de abortamentos, como o que ocorreu na Holanda em 2005 e 2009 (VAN DEN BROM et al., 2015). A capacidade de infecção dos aerossóis de *C. burnetii* é grande e pode causar a doença em pessoas que se encontram até 30 km de uma fazenda-foco (TISSOT-DUPONT et al., 2004), resultando em casos de febre Q distante das áreas primárias contaminadas. Esta característica de disseminação faz com que, constantemente, os casos de febre Q sejam diagnosticados em pessoas sem contato recente com animais. Durante o inverno de 1998 a 1999, a alta incidência de febre Q aguda no distrito de Bouches-du-Rhone, na França, foi associada a maior frequência de vento mistral logo após a temporada de parto, um mês antes do início da doença (TISSOT-DUPONT et al., 2004). No Reino Unido, o aumento incomum do vento sul foi observado pouco antes de grande epidemia em Birmingham (HAWKER et al., 1998).

A sazonalidade também parece influenciar no aumento da incidência da febre Q. Em áreas tropicais, a incidência aguda da doença pode estar relacionada à estação chuvosa, como foi observado em Queensland, Austrália, 3 meses após pico de chuva no mês de fevereiro (HARRIS et al., 2013). Já em Caiena, a incidência de

febre Q aguda foi maior em julho, 2 meses após o pico da precipitação em maio, coincidindo com a estação de reprodução da preguiça de três dedos, provável reservatório selvagem da infecção (DAVOUST et al., 2014).

C. burnetii também foi isolada em muitas espécies de carrapatos, sugerindo que esses artrópodes servem como vetores da bactéria. Finalmente, demonstrou-se que o micro-organismo é capaz de se multiplicar no interior de amebas, sugerindo a participação desses hospedeiros na persistência ambiental da bactéria (ELDIN et al., 2017).

2.5 – A enfermidade em humanos

A infecção por *C. burnetii* em humanos resulta na enfermidade conhecida como febre Q e pode ser dividida, de forma ampla, em aguda ou crônica. Os humanos geralmente adquirem a infecção por inalação de partículas a partir de reservatórios animais, especialmente ruminantes domésticos (MAURIN e RAOULT, 1999; ANDERSON et al., 2013). Contudo, outros animais domésticos e silvestres como coelhos, aves, gatos, cães, podem estar envolvidos na disseminação da bactéria (OIE, 2018).

A doença aguda pode apresentar diversas formas, a depender do órgão ou sistema acometido, sendo mais comumente caracterizada por febre autolimitada, pneumonia e hepatite (RAOULT, 2012; MARRIE et al., 2015). Casos de meningite, encefalite, pericardite e miocardite já foram relatados na literatura, demonstrando o amplo espectro de tecidos que podem ser colonizados pela bactéria (ANGELAKIS e RAOULT, 2010; RAOULT, 2012; MARRIE et al., 2015).

Por apresentar sintomatologia inespecífica durante a infecção aguda, a febre Q costuma ser subdiagnosticada. Além do quadro de pneumonia (alteração comum da afecção aguda), também são observadas alterações como febre alta, cefaleia, dor retrorbital, fotofobia, bradicardia, hepatomegalia e esplenomegalia (ANGELAKIS e RAOULT, 2010; SEITZ, 2014; MARRIE et al., 2015). Em estudo realizado no Canadá em pacientes com pneumonia por febre Q, não foram observadas alterações nos parâmetros sanguíneos, embora 50% dos pacientes apresentassem enzimas hepáticas elevadas e 27% dos pacientes, hipoxemia. Radiograficamente, a

pneumonia por *C. burnetii* pode ser indistinguível da pneumonia causada por outros agentes (GIKAS et al., 1999), embora seja possível observar opacidades de aspecto arredondado (MARRIE et al., 2015).

A hepatite devido à febre Q possui diferenças regionais quanto a sua prevalência sugerindo estar associada à estirpe envolvida (MARRIE et al., 2015). No Canadá, entre 1981 a 1982, foi a alteração dominante em surto de febre Q na região de Ontário, enquanto que na província de Nova Escócia, somente foi observado pneumonia (SRIGLEY et al., 1985). Em pacientes com hepatite, a febre costuma ser elevada e, comumente, estes indivíduos são classificados como moderadamente a severamente doentes (MARRIE et al., 2015). Um achado comum, mas não específico, em biópsia de fígados acometidos por *C. burnetii* é a presença de granulomas tipo “donnut”, que consiste de um anel denso de fibrina circundado por vacúolos de lipídeos centrais (SRIGLEY et al., 1985; LEE et al., 2012). Esse tipo de granuloma também é observado na doença de Hodgkin e mononucleose infecciosa (MARRIE et al., 2015). Algumas pessoas acometidas por hepatite decorrente da febre Q aguda podem apresentar anticorpos anti-músculo liso e anti-fosfolipídeo (ORDI-ROS et al., 1994), que podem dar origem a doenças hepáticas autoimunes, como a cirrose biliar primária (KAECH et al., 2009).

A recuperação completa da febre Q aguda é o desfecho mais comum, contudo, em 20% dos pacientes pode ocorrer a Síndrome de Fadiga Pós Febre Q que apresenta sinais como fadiga, cefaleia, sudorese, artralgia, mialgia, visão embaçada, fasciculações musculares, além de linfadenomegalia e sensibilidade nos linfonodos (MARRIE et al., 2015). Evidências sugerem que esta síndrome é decorrente da persistência de *C. burnetii*, ou seus antígenos, no hospedeiro levando à imunomodulação e desregulação de citocinas (PENTTILA et al., 1998).

Outra possível complicação é o desenvolvimento da enfermidade crônica. O diagnóstico diferencial de febre Q em pacientes com endocardite e com cultura negativa para outros patógenos é importante, uma vez que esta é a apresentação mais comum (MARRIE et al., 2015; ELDIN et al., 2017). Em certas regiões da Europa, como em Marselha, no sul da França, o patógeno foi responsável por 16% dos casos de endocardite avaliados entre os anos de 1995 e 1996 (FOURNIER et al., 1996). A suspeita diagnóstica geralmente está associada à endocardite atípica

em pacientes com válvula anormal ou biprotética e com infecção sem causa definida ou síndrome inflamatória. Por vezes, o tempo médio entre o início dos sinais e o diagnóstico definitivo leva em torno de 12 meses (WEGDAM-BLANS et al., 2012). A bactéria forma conjuntos celulares que aparenta uma massa única intracitoplasmática dentro de células mononucleares, ocupando todo o citoplasma, sendo possível observar nas válvulas infiltrados de macrófago repletos de *Coxiella* (BROUQUI et al., 1994). Com menor frequência, a febre Q crônica também pode se manifestar como infecções vasculares que podem resultar em ruptura de aneurismas, fístulas aorto entéricas e êmbolos em membros inferiores, causando dor, febre e perda de peso (MARRIE et al., 2015; ELDIN et al., 2017).

Quando da ocorrência da doença durante a gravidez, podem surgir complicações obstétricas como abortamentos, retardo do crescimento intrauterino, morte fetal, parto prematuro e oligodrâmnio (GÜRTLER et al., 2014; MARRIE et al., 2015). Angelakis et al. (2013), investigando isolados de *C. burnetii* provenientes de placentas de mulheres da França e da Holanda, observaram que as estirpes que estavam associadas ao abortamento geralmente apresentavam plasmídeos QpDV, indicando possível relação entre o genótipo da cepa envolvida com o tipo de complicação possível. Neste mesmo estudo confirmou-se que o tratamento prolongado (≥ 5 meses) com cotrimoxazole em mulheres grávidas com diagnóstico de febre Q pode prevenir complicações e está associado, de forma significativa, com a sobrevivência do recém-nascido (ANGELAKIS et al., 2013).

2.6 – Epidemiologia

Em revisão da literatura publicada por GUATTEO et al. (2011) é possível observar que a detecção da infecção por *C. burnetii* está presente nos cinco continentes, independentemente das espécies avaliadas. A prevalência aparente é ligeiramente maior nos bovinos (em média, 20% e 37,7% de prevalência aparente para animal e rebanho, respectivamente) do que nos pequenos ruminantes (centrada entre 15% e 25%, respectivamente, para animais e rebanhos, em ovinos e caprinos).

Em recente publicação, o DNA de *C. burnetii* foi detectado através de PCR em 25% das 93 amostras de placentas abortadas de ruminantes na Grã-Bretanha. Um dos rebanhos de cabras infectadas foi monitorado durante o estudo por 31 meses e 92% (57/62) das amostras placentárias de cabras abortadas e não abortadas foram positivas, assim como 30% de 33 amostras fetais (JONES et al., 2010).

Entre 2007 e 2010, a Holanda enfrentou o maior surto de febre Q já relatado, com mais de 4.000 casos humanos confirmados e estimativa de mais de 40.000 casos totais (ROEST et al., 2011b). Estudo retrospectivo demonstrou que a epizootia havia começado em 2005, com taxas de abortamento superiores a 60% em algumas fazendas de cabras e ovelhas (ROEST et al., 2011a). A combinação de grande número de animais infectados, a localização das fazendas próximas a áreas populosas, a falta de vigilância e o baixo nível de imunidade na população humana provavelmente contribuíram para a magnitude da epidemia de febre Q. Devido à ineficácia das medidas de controle e a presença de casos fatais em humanos, foi decidido, em dezembro de 2009, pelo abate sistemático de cabras e ovelhas prenhes, levando a eliminação de mais de 50 mil cabras (SCHNEEBERGER et al., 2014). Em 2010, o número de casos notificados em humanos começou a diminuir, provavelmente devido ao abate de pequenos ruminantes e ao aumento da imunização da população. Este grande surto revelou que, apesar do conhecimento microbiológico sobre a infecção por *C. burnetii*, a re-emergência dos casos e a disseminação não podem ser previstas (ELDIN et al., 2017).

No continente Africano, *C. burnetii* já foi detectada em humanos e em várias espécies animais com ampla variação na prevalência (VANDERBURG et al., 2014). Pesquisas em bovinos demonstraram ocorrência do patógeno variando de 4% no Senegal, a 55% na Nigéria. A presença do DNA do patógeno no leite bovino foi detectada em 22% das amostras de leite cru no Egito, em 63% das amostras de leite de bovinos criados extensivamente e 43% das amostras em rebanhos criados em sistema semi-intensivo na Nigéria. A soroprevalência em humanos variou de 1% no Chade, a 32% em uma vila do delta do Nilo, no Egito (VANDERBURG et al., 2014). No Senegal, *C. burnetii* também foi detectada por PCR em 1,2% da população febril de uma zona rural (ELDIN et al., 2017). A coxielose também já foi demonstrada em ovelhas, cabras, cães e camelos, nesta última espécie com 80% de prevalência aparente (VANDERBURG et al., 2014).

Na Índia, um estudo realizado com 920 amostras de vacas, búfalos, ovelhas e cabras com histórico de transtornos reprodutivos (abortamento, reprodução repetida, retenção de placenta e endometrite) reportou uma prevalência geral de 13,82%. Verificou-se que entre as espécies a presença de *C. burnetii* foi de 12,78% em bovinos, 16,66% em búfalos, 11,04% em ovinos e 6,13% em cabras. A alta taxa de eliminação do patógeno observado no estudo, particularmente no leite, aponta para potencial risco em saúde pública (VAIDYA et al., 2010).

No Japão, dos 207 bovinos com distúrbios reprodutivos avaliados, aproximadamente 60% foram positivos na RIFI e 24% das amostras de leite apresentaram o DNA do patógeno na detecção molecular. Os autores concluíram que bovinos com alterações reprodutivas são importantes reservatórios do micro-organismo para a infecção tanto animal como humana (TO et al., 1998).

Enzoótica nos Estado Unidos, a febre Q apresentou aumento de 250% dos casos reportados depois que a doença tornou-se de comunicação obrigatória (MCQUISTON et al., 2006). Neste mesmo estudo foi descrito que somente quatro estados dos EUA não reportaram a enfermidade. Entre 1978 e 1999, 436 casos humanos haviam sido relatados e, após o início da obrigatoriedade de notificação, 255 casos foram evidenciados entre 2000 e 2004. Ainda nos EUA, os estudos em animais têm mostrado ampla variação na soroprevalência onde rebanhos caprinos demonstraram prevalência aparente de 41,6%, ovelhas 16,5% e bovinos 3,4% (MCQUISTON e CHILDS, 2002). A evidência de anticorpos para *C. burnetii* foi relatada em muitas espécies de animais selvagens, incluindo coiotes, raposas, roedores, gambás, guaxinins, coelhos, cervos e aves, sugerindo que a bactéria é enzoótica entre ruminantes e animais selvagens em grande parte dos Estados Unidos e que existe exposição humana generalizada ao patógeno (MCQUISTON e CHILDS, 2002). MCQUISTON et al (2006) enfatizaram que a vigilância para febre Q é essencial no conhecimento da distribuição e magnitude da doença e para o preparo de atividades antiterrorismo.

Em Caiena, a capital da Guiana Francesa, *C. burnetii* foi o agente envolvido em 24% de todas as pneumonias adquiridas na comunidade, maior prevalência já relatada no mundo (EPELBOIN et al., 2012). Nesta mesma cidade, em estudo recente, o DNA da bactéria detectado por qPCR em carrapatos, baço e fezes de

uma preguiça de três dedos (DAVOUST et al., 2014). Além disso, a incidência de febre Q aguda em Caiena está relacionada com a estação chuvosa e com nascimentos de preguiças de três dedos. Clinicamente, em Caiena, as pneumonias causadas por *C. burnetii* mostram apresentação inicial mais grave, com cefaleias mais frequentes, calafrios e suores noturnos, do que a pneumonia causada por outros micro-organismos (EPELBOIN et al., 2012). Essas características atípicas parecem estar relacionadas com a presença de um único clone de *C. burnetii*, MST 17, que até agora só foi isolado nesta área. Este clone também parece ser mais virulento em modelos animais (ELDIN et al., 2017).

2.7 – Febre Q / Coxielose no Brasil

A infecção por *C. burnetii* foi relatada em inquéritos sorológicos no Brasil há mais de 50 anos (BRANDÃO et al., 1953; VALLE et al., 1955; RIBEIRO-NETO et al., 1964; RIEMANN et al., 1975), mas desde então, pouca informação sobre a infecção está disponível no país. Apesar dos relatos sobre a circulação do agente da febre Q em território nacional e o fato de ser uma zoonose de distribuição mundial, por razões inexplicáveis, a enfermidade recebeu pouca atenção no país.

O primeiro estudo que evidenciou a presença da Febre Q no território nacional foi realizado por BRANDÃO et al. (1953) demonstrando a presença de anticorpos fixadores de complemento anti-*C. burnetii* em trabalhadores de um frigorífico situado na cidade de São Paulo. Dos 462 soros testados, 1,6% (n=8) foram positivos. No mesmo estudo, 170 soros provenientes de trabalhadores de uma fábrica de vidro também foram analisados e 1,76% (n=2) foram sororreagentes para o patógeno. Estes resultados deram origem a outro estudo sorológico, publicado em 1955, em que foi realizada avaliação de bovinos e tratadores no estado de São Paulo. Dos 71 tratadores avaliados, cinco (7%) apresentaram resultados positivos significantes na sorologia, e dos 171 soros de bovinos analisados 14% (24) foram positivos. Ainda neste estudo, os autores relataram a entrada, em São Paulo, de animais positivos para coxielose provenientes da Holanda e da Inglaterra (VALLE et al., 1955).

Em 1956, em revisão sobre as doenças do grupo tifo exantemático (tifo exantemático neotrópico, tifo murinho e febre Q), os estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro já eram descritos como locais com incidência de Febre Q (MAGALHÃES, 1956).

Investigação epidemiológica conduzida para comparar a prevalência e fatores ambientais para a toxoplasmose (*Toxoplasma gondii*) e Febre Q em pessoas associadas às escolas de Medicina Veterinária de Davis, EUA, e de Belo Horizonte, MG demonstrou que, dos 219 brasileiros avaliados, 46% (n=100) apresentaram reatividade ao teste de hemaglutinação indireta para *T. gondii* e 22% (n=48) reação positiva para *C. burnetii* (RIEMANN et al., 1974). Aproximadamente 7% dos indivíduos testaram positivos para ambos os patógenos, e pessoas soropositivas aos antígenos tinham maior contato com animais (de espécies diversas) do que pessoas soronegativas (RIEMANN et al., 1974).

No ano seguinte, RIEMANN et al. (1975) avaliara a prevalência de anticorpos para *T. gondii* e *C. burnetii* em trabalhadores de um frigorífico situado na cidade de Belo Horizonte e dos animais abatidos neste estabelecimento. Aproximadamente 29% (n=42) dos 144 funcionários se mostraram reativos ao teste de microaglutinação para *C. burnetii*, e a prevalência de anticorpos para febre Q foi de duas a três vezes maior em funcionários que trabalhavam nos currais (40%) e na sala de matança (36%) do que em funcionários que trabalhavam na salsicharia (14%) e sala de desossa (20%). Este fato foi justificado como resultado da exposição aos aerossóis provenientes das etapas de abate e da poeira formada nos currais de espera. Entre os 156 animais amostrados, 29% (n=45) apresentaram anticorpos contra coxielose. Os autores concluíram que estes níveis de infecção bovina são suficientes para expor (e infectar) as pessoas que processam a carne diariamente e que a exposição periódica a bovinos cronicamente infectados pode resultar em doenças esporádicas não diagnosticadas ou infecções subclínicas.

A presença de anticorpos para *Bartonella* spp. e *C. burnetii* foi avaliada em 61 pacientes com diagnóstico de endocardite em um hospital de cardiologia da cidade de São Paulo, com o intuito de determinar o envolvimento destes patógenos nos casos de endocardites. Um paciente apresentou títulos de IgG para fases I e II $\geq$

6.400 para *C. burnetii*. Os autores concluíram que a Febre Q no Brasil pode ser uma enfermidade subdiagnosticada ou não reportada (SICILIANO et al., 2006).

Em 2006, uma publicação de uma série de casos contendo 16 pacientes com diagnóstico da doença no estado de Minas Gerais sugeriu a inclusão da doença no diagnóstico diferencial em casos de enfermidades febris (COSTA et al., 2006). Dos 726 casos de febre avaliados, 16 foram incriminados como febre Q (2,2%) pela técnica de Imunofluorescência indireta para antígeno de fases I e II. O principal sinal clínico foi síndrome gripal (50%), seguido de pneumonia (12,5%), febre de origem desconhecida (12,5%), síndrome de mononucleose (12,5%), linfadenite (6,3%), e espondilocistite associada com osteomielite (6,3%) (COSTA et al., 2006).

A febre Q não costuma causar grandes complicações apesar do relato de um caso mais grave com óbito em um indivíduo do estado da Bahia que apresentou dispneia progressiva durante um ano e evolução para óbito devido à endocardite mesmo após a antibioticoterapia com doxiciclina e ciprofloxacina (SICILIANO et al., 2008). O paciente em questão trabalhava na lavoura e com bovino de leite, além de consumir leite cru rotineiramente.

Em estudo com objetivo de determinar a soroprevalência e detectar o DNA de *C. burnetii* em pacientes positivos para HIV na cidade de Jacarepaguá, no estado do Rio de Janeiro, LAMAS et al. (2009) encontraram 3,2% (4/125) de soropositividade, mas não obtiveram sucesso na detecção do DNA bacteriano nas amostras clínicas. Dentre os pacientes positivos, dois apresentaram também soropositividade para *Bartonella* spp. (LAMAS et al., 2010). Estes resultados são similares aos relatados por COSTA (2005) que, em estudo sorológico para *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *C. burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana* e *Ehrlichia chaffeensis* em 437 pessoas saudáveis de uma comunidade rural brasileira encontraram, respectivamente 1,6% (n=7); 1,1% (n=5); 3,9% (n=17); 13,7% (n=60); 12,8% (n=56) e 10,5% (n=46). A idade acima de 40 anos e a residência rural foram significativamente associadas a algumas, mas não a todas as taxas de infecção (COSTA, 2005).

A primeira detecção molecular do patógeno da febre Q no Brasil foi em 2011. Até então não havia estudos descrevendo a bactéria em amostras clínicas, apesar de inquéritos indicando humanos sororreagentes. LEMOS et al. (2011) detectaram

C. burnetii por PCR, em amostra de soro de um paciente de 47 anos de idade habitante do município de Itaboraí, RJ, que apresentou sinais de febre inespecífica por 40 dias associada à trombocitopenia. O paciente relatou que, três meses antes do início dos sinais clínicos, havia adquirido 12 cabras para fornecimento de leite tanto para a comunidade como para a própria família e que três destas cabras haviam abortado três semanas antes do início das manifestações clínicas. Ademais, um dos cães do casal havia morrido e uma cadela abortado durante o período de adoecimento do paciente. Foram testadas amostras dos 14 cães e 2 gatos que o casal possuía, e da esposa do indivíduo. Dois cachorros e a esposa do paciente apresentaram reatividade à RIFI.

Em outro caso de Febre Q, uma pessoa que trabalhava em escritório em frente a uma clínica veterinária no estado do Rio de Janeiro foi diagnosticada com a enfermidade após a detecção molecular em soro e lavado brônquio-alveolar coletado no sétimo dia após o início dos sinais clínicos. Foi observado aumento de oito vezes no título de anticorpos em amostras de soro coletadas nos dias 7 e 27 da doença, compatível com o quadro de febre Q (ROZENTAL et al., 2012).

Em 2013, estudo com 51 amostras mantidas em parafina no Departamento de Patologia do Instituto Nacional de Cardiologia, pertencentes a válvulas cardíacas excisadas de pacientes com endocardite, entre 1998 e 2009, foram analisadas por PCR para a presença de *C. burnetii*, *Bartonella* spp. *Staphylococcus aureus*, e outros patógenos (LAMAS et al., 2013). Dez (19%) pacientes foram positivos para algum dos patógenos pesquisados, a saber: *Streptococcus oralis* (n=6), *S. oralis* e *Bartonella* (n=1), *Bartonella* spp. (n=1), *C. burnetii* (n=1) e *S. aureus* (n=1). A paciente com febre Q era uma mulher com bioprótese de válvula mitral e histórico de contato com filhotes de cães recém-nascidos antes do início dos sinais. Os autores referiram que a febre Q é uma zoonose sub-diagnosticada no Brasil e que pacientes com endocardite e cultura de sangue negativa devem ser submetidos à sorologia para *C. burnetii* e *Bartonella* spp. (LAMAS et al., 2013).

A confirmação da presença da coxielose em animais do estado do Rio de Janeiro foi relatada por MARES-GUIA et al. (2014) com base na identificação molecular do patógeno devido a uma investigação da fonte de infecção do primeiro caso humano de febre Q relatado por LEMOS et al. (2011). Seis amostras de leite

de cabra e duas amostras de sangue de cães foram positivas no diagnóstico molecular. No mesmo estudo, 2 cães, 2 ovelhas e 5 cabras foram soropositivas para IgG de fase II (antígeno de fase aguda). A detecção da sequência parcial do gene *htpAB* presente no genoma de *C. burnetii* indicou a circulação em cabras e cães na área rural de Itaboraí e a infecção em animais domésticos da região estudada (MARES-GUIA et al., 2014).

O caráter ocupacional da doença também foi verificado em 8 (8,7%) de um total de 92 profissionais de abrigo de cães que apresentaram anticorpos anti-*C. burnetii*, reforçando que medidas preventivas devem ser adotadas para reduzir os riscos ocupacionais e especialmente em trabalhadores de canis (NOGUERA, 2015).

O caso de febre Q ocorrido em Itaboraí motivou outros inquéritos epidemiológicos na região. Foram avaliados por análise molecular e sorologia 272 pacientes com suspeita de dengue, 35 animais domésticos da região (13 cães, 13 gatos e 9 ovelhas) e 59 animais silvestres. Na análise sorológica, 26 (10%) dos pacientes com suspeita de dengue, 1 cão, 3 gatos e 2 ovelhas foram sororreagentes para *C. burnetii*, destes, três (3,3%) foram positivos na nested PCR para o gene *IS1111*. Devido aos resultados observados, os autores sugeriram a inclusão da Febre Q no diagnóstico diferencial para dengue (MARES-GUIA, 2015; MARES-GUIA et al., 2016).

Estudo retrospectivo com pacientes afetados por endocardites e com cultura negativa, entre os anos de 2004 a 2009, indicou que a pesquisa por sorologia para *Bartonella* spp. e *C. burnetii* pode ser úteis para o diagnóstico. Dos 51 pacientes com endocardite e cultura negativa, quatro (7,8%) foram positivos tanto na sorologia (IgG anti-fase I $\geq 1:800$) como na detecção por PCR. No total de todas as endocardites avaliadas (n=221), *C. burnetii* apresentou prevalência de 1,8% (SICILIANO et al., 2015).

O estudo mais recente publicado sobre a presença de *C. burnetii* no Brasil foi realizado em animais silvestres capturados na Mata Atlântica em oito municípios do Rio de Janeiro. Dos 131 roedores capturados, 4,6% (6/131) foram positivos para o patógeno, dos quais *Akodon cursor* (rato-do-chão) o hospedeiro mais frequente (3/6), seguido por *Mus musculus* (1/6), *Oxymycterus dasytrichus* (1/6) e *Oligoryzomys nigripes* (1/6). A presença da bactéria no ciclo silvático foi confirmada,

demonstrando o risco potencial de transmissão para humanos, uma vez que a maioria destas espécies possuem comportamento sinantrópico (ROZENTAL et al., 2017).

2.8 – Métodos de diagnóstico

O cultivo microbiológico de *C. burnetii* é trabalhoso, demorado e de considerável risco. Por esta razão, os métodos de diagnóstico indireto são amplamente utilizados durante a rotina diagnóstica de febre Q (ELDIN et al., 2017). A sorologia ainda é o principal método para o diagnóstico da infecção. A utilização de real-time PCR (qPCR) em amostras clínicas como sangue, válvulas cardíacas e outros tecidos de biópsia é uma realidade útil para a detecção da bactéria antes de ocorrer a soroconversão e importante para o tratamento precoce da enfermidade (SCHNEEBERGER et al., 2010; ANDERSON et al., 2013). O isolamento de *C. burnetii* pode ser realizado somente em laboratórios de nível de biossegurança 3 (BSL – 3) ou maior, o que torna difícil a utilização desta técnica no diagnóstico de rotina. A imuno-histoquímica é outro método utilizado no diagnóstico quando estão disponíveis amostras de tecidos infectados (ANDERSON et al., 2013; ELDIN et al., 2017).

O quadro 1 resume os métodos diagnósticos utilizados em medicina veterinária e seus propósitos.

QUADRO 1. Aplicações dos métodos diagnóstico para coxielose. Adaptado de (OIE, 2018).

Método	Propósito					
	População livre da infecção	Atestado individual de livre da infecção antes de movimentação	Políticas de erradicação	Confirmação de casos clínicos	Prevalência da infecção – vigilância	Imunidade pós vacinação
Identificação do agente						
PCR	+++	n/a	+++	+++	++	+
Cultura	+	n/a	+	–	+	–
Coloração	+	n/a	+	+	+	–
Genotipagem	n/a	n/a	n/a	n/a	++	n/a
Deteção de resposta imune						
ELISA	+++	n/a	+++	++	+++	+++
RIFI	++	n/a	++	++	++	++
TFC	–	n/a	–	++	+	+

Legenda: +++ = método recomendado; ++ = método adequado; + = aplicação limitada; – = não apropriado para o propósito; n/a = não aplicável. PCR = Reação em Cadeia da Polimerase; ELISA = Ensaio imuno-enzimático; RIFI = Reação de Imunofluorescência indireta; TFC = Teste de fixação de complemento.

2.8.1 – Sorologia

A sorologia é a primeira linha de diagnóstico. A interpretação do resultado sorológico em humanos deve ser analisada com base na diferença de reatividade aos antígenos de fase I e fase II. O antígeno de fase I, que é obtido a partir de fígado de ratos infectados, é a forma mais virulenta e infecciosa, estando associada com a infecção persistente (crônica). O antígeno de fase II, forma avirulenta, é obtido após

passagens sucessivas em laboratório em ovos embrionados ou cultura de células (ANDERSON et al., 2013; OIE, 2018).

Na fase aguda da febre Q em humanos, anticorpos anti-fase II são detectáveis entre 7 a 15 dias após o início dos sinais e apresentam títulos maiores do que os anticorpos anti-fase I (WEGDAM-BLANS et al., 2012; ANDERSON et al., 2013; ELDIN et al., 2017). Os anticorpos para fase II começam a desaparecer entre 3 a 6 meses após a infecção (ANDERSON et al., 2013). Em humanos, anticorpos anti-fase II são detectáveis em 90% dos pacientes a partir da terceira semana (FOURNIER et al., 1998), assim, o diagnóstico da primeira infecção é firmado com a constatação do aumento de quatro vezes o título de anticorpos fase II entre duas amostras coletadas com 3 semanas de diferença (ANDERSON et al., 2013). O ideal é que a primeira amostra de soro seja coletada durante a primeira semana da doença e estocada a -20°C até que seja obtida a segunda amostra do período de convalescência para que ambas sejam testadas juntas, eliminando, assim, a variação entre testes (ANDERSON et al., 2013). Os valores de corte (*cutoff*) para títulos positivos variam entre os países, mas, em geral, títulos de IgG de fase II ≥ 200 e / ou IgM ≥ 50 são significantes para o diagnóstico da infecção primária (FOURNIER et al., 1998), sendo que os títulos de IgG de fase II tendem a ser maiores do que os de fase I na infecção aguda. Títulos de IgG de fase I elevados (título IgG I $\geq 1: 800$) estão associados a febre Q crônica e sua magnitude diretamente relacionada com o valor preditivo positivo para o diagnóstico de endocardite por *C. burnetii*.

Nos animais, os métodos para diagnóstico de coxielose possibilitam somente interpretação para rebanhos e não para os animais individualmente. Soma-se ao fato que os resultados devem levar em consideração o histórico do rebanho como, a presença de abortamentos, a movimentação e introdução de animais e a vacinação. Os testes de ELISA e RIFI são mais indicados para o uso na medicina veterinária por possuírem maior sensibilidade. O teste de ELISA vem sendo mais utilizado devido a possibilidade de automação e a robustez (OIE, 2018), e por apresentar alta sensibilidade e boa especificidade quando comparada com outros métodos sorológicos (NIEMCZUK et al., 2014). Os kits comerciais detectam anticorpos de fases I e II (OIE, 2018), entretanto não são validados e harmonizados em sua totalidade.

A RIFI é adaptada da técnica utilizada para a detecção em humanos com mudança somente no conjugado. Vale ressaltar que a interpretação do resultado como agudo e crônico não é válido para animais. A titulação de IgM e IgA é realizada após a remoção de IgG, utilizando um adsorvente de fator reumatoide para eliminar resultados falsos positivos (IMBERT e LA SCOLA, 2006). Além disso, os soros são diluídos em solução salina tamponada com fosfato (PBS) com 3% de leite em pó, sem gordura, para saturar o sítio antigênico e evitar fixação inespecífica de anticorpos. Para os soros com títulos inferiores ao ponto de corte, a sorologia deve ser repetida dentro de 10 a 15 dias para confirmar ou excluir o diagnóstico (ELDIN et al., 2017). As reações cruzadas com *Legionella micdadei* e *Bartonella* sp. foram descritas na RIFI (LA SCOLA e RAOULT, 1996; MUSSO e RAOULT, 1997).

A pesquisa sorológica é uma boa ferramenta para avaliar a prevalência. A presença de anticorpos específicos anti-*C. burnetii* fornece evidência de infecção recente, bem como exposição pregressa. Os ensaios sorológicos são adequados para rastrear rebanhos, mas não possuem utilidade para avaliação individual, já que proporção significativa de animais que eliminam *C. burnetii*, e até mesmo alguns animais que abortaram devido à coxielose, são soronegativos (TO et al., 1998; GUATTEO et al., 2011; NIEMCZUK et al., 2011, 2014). A estratégia de amostragem deve levar em consideração a possibilidade de baixa prevalência se não houver dados disponíveis de ocorrência na área a ser avaliada.

Animais só podem ser confirmados individualmente como livres se o rebanho estiver livre e não apresentar histórico sorológico ou sinais clínicos de coxielose. A determinação do estado imunológico de populações após a vacinação deve basear-se nos testes mais sensíveis (ELISA ou RIFI) e, se possível, deve ser associada ao teste de PCR de esfregaços vaginais coletados no parto. A combinação de soroconversão com a ausência de eliminação vaginal no parto subsequente é indicativa de proteção imune (OIE, 2018).

2.8.2 – Isolamento

O isolamento de *C. burnetii* não é recomendado para a rotina diagnóstica por ser laborioso e requerer estrutura de laboratório com biossegurança nível 3 (ANDERSON et al., 2013; MARRIE et al., 2015; OIE, 2018). Além disso, pacientes

humanos apresentando febre Q geralmente são tratados com antibióticos antes do cultivo microbiológico, o que dificulta o isolamento e, portanto, a presença de cultura negativa para o patógeno não significa ausência de infecção (ANDERSON et al., 2013). Em amostras com alta quantidade de *C. burnetii* e baixa contaminação por outros micro-organismos, é possível realizar o isolamento por inoculação em ovos embrionados de galinhas e cultura celular (OIE, 2018). A técnica de “shell vial” é útil para o isolamento do patógeno e para determinação de sensibilidade aos antibióticos (MARRIE et al., 2015).

A natureza intracelular deste micro-organismo torna difícil o isolamento em meios axênicos. No entanto, recentemente, duas culturas axênicas foram desenvolvidas, um meio a base de extrato de células vero (MECV) e o meio citrato cisteína acidificado 2 (ACCM2). Somente no ACCM2 foi possível isolamento de *C. burnetii* em meio sólido (ELDIN et al., 2017). Este meio possibilitou multiplicação substancial de cerca de 3 logs de *C. burnetii*, após 7 dias de incubação, observadas em placas de ágar sólido (OMSLAND et al., 2009).

2.8.3 – Diagnóstico Molecular

Diversos testes baseados em PCR foram desenvolvidos para a detecção de *C. burnetii* em amostras clínicas. O diagnóstico molecular em amostras de origem animal e humanas foi elaborado para a detecção de sequências-alvo de diferentes plasmídeos, de RNA 16S-23S, do gene superóxido dismutase, do gene *com1* ou do elemento repetitivo *IS1111*, com níveis de detecção variando de 10 a 10² bactérias (ELDIN et al., 2017). O sistema de nested PCR também foi utilizado por alguns anos, mas caiu em desuso por apresentar pouca especificidade. Por ser mais prática de realizar e ter a vantagem de quantificação do micro-organismo, a técnica de PCR em tempo real (qPCR) se tornou a mais usada no diagnóstico da febre Q (ELDIN et al., 2017).

A técnica de qPCR para o gene *IS1111* é a mais sensível, capaz de detectar a bactéria em soro de pacientes nas primeiras duas semanas da infecção, período em que a sorologia ainda não é positiva, e também em amostras de sangue de pacientes com infecção persistente (ROLAIN e RAOULT, 2005). Em estudo conduzido durante o surto na Holanda, este ensaio mostrou sensibilidade,

especificidade, valor preditivo positivo e negativo de 92,2%, 98,9%, 99,2% e 89,8%, respectivamente (WIELDERS et al., 2013). As sequências de inserção (IS) são tipicamente raras em bactérias intracelulares obrigatórias devido às poucas oportunidades para troca genética. Os elementos IS são envolvidos nos rearranjos cromossômicos observados entre as cepas (BEARE et al., 2009) e no aumento da diversidade genética de *Coxiella* sp. por translocação, perda ou rearranjo genômico durante a transposição. Os rearranjos mediados por IS também podem estar envolvidos na pseudogenização e no potencial de virulência diferencial de várias cepas de *C. burnetii* (MARRIE et al., 2015). A análise de sequenciamento do genoma de NM mostrou 21 cópias de *IS1111*, fato que está relacionado a alta sensibilidade na qPCR (SESHADRI et al., 2003), e revelou cinco elementos similares a *IS30* e três *ISAs1*, mostrando dezenas de elementos IS. Curiosamente, os elementos IS foram encontrados ausentes em todos os plasmídeos de *Coxiella*, exceto o QpDG, que tinha um único elemento *IS4* (SESHADRI et al., 2003; BEARE et al., 2009). O alto grau de conservação dentro de cada família de IS sugere que os elementos foram "recentemente" adquiridos e depois disseminados por todo o genoma de *Coxiella* (MARRIE et al., 2015).

2.9 – Genotipagem

A genotipagem das bactérias é essencial, atualmente, na compreensão da epidemiologia molecular das doenças infecciosas, possibilitando encontrar a fonte de infecção animal de surtos humanos. Os métodos de tipagem inicial usados antes de 2005 foram baseados em tipos plasmídicos (SAMUEL et al., 1985), eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) (JAGER et al., 1998), polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) analisados com SDS-PAGE (HENDRIX et al., 1990) e análise sequencial de genes incluindo *com1*, *mucZ*, *icd* e *16S / 23S* (STEIN et al., 1993; SEKEYOVÁ et al., 1999; VAN NGUYEN e HIRAI, 1999). Esses métodos mostraram ter graus variados de poder discriminatório e seu uso rotineiro não pôde ser estabelecido como resultado da reprodutibilidade limitada dentro e entre os laboratórios (TOMAN et al., 2012). Recentemente, outros métodos de genotipagem baseados em sequências de alta resolução, como tipagem multispacer sequence typing (MST) (GLAZUNOVA et al., 2005) e análise em multilocus de repetições em tandem de número variável

(MLVA) (ARRICAU-BOUVERY et al., 2006) tornaram-se as abordagens mais comumente empregadas.

Outras técnicas baseadas em polimorfismo único de nucleotídeo (SNP) também foram desenvolvidas de forma a manter correlação com a tipagem por MST e, assim, permitir a comparação de resultados anteriormente publicados. Hornstra et al. (2011) desenvolveram uma metodologia de detecção de SNP por Melt Analysis of Mismatch Amplification Mutation Assays (Melt-MAMA) analisando os 10 espaços intergênicos utilizados para a tipagem por MST. A técnica, apesar de ser mais barata em relação ao sequenciamento dos espaços de MST, apresenta alta taxa de falhas, é de difícil otimização e trabalhosa devido ao grande número de ensaios que precisam ser realizados para se determinar o tipo MST específico (BIRDSELL et al., 2012). Outro estudo também baseado na detecção de SNPs dos espaços intergênicos descrito por Glazunova utilizou a discriminação por sondas fluorescentes (PEARSON et al., 2014) para a determinação do grupo de MST de cepas de *C. burnetii*, contudo, a utilização de sondas para a detecção de diferentes SNPs aumenta o custo da técnica, tornando-a proibitiva para o uso rotineiro.

Uma técnica promissora descrita por MCLAUGHLIN et al. (2017) agrupa os já existentes genótipos de MST de *C. burnetii* em 6 grupos genômicos através do sequenciamento do gene 16S rRNA e consequente visualização de 5 possíveis SNPs. Devido a maior preservação desse gene em relação aos espaços intergênicos, a utilização dessa metodologia parece ser mais robusta e de grande utilização epidemiológica, apesar do menor poder de discriminação. Ademais, a necessidade de sequenciamento de somente uma parte do genoma ao invés de 10 espaços torna a técnica mais barata que a descrita por Glazunova et al. (2005).

CAPÍTULO 3 – PREVALENCE OF *Coxiella burnetii* SLAUGHTERHOUSES AND IMPLICATION FOR PUBLIC HEALTH.

(Plos ONE – <https://journals.plos.org/plosone/s/submission-guidelines>)

Mateus de Souza Ribeiro Mioni¹, Francisco Borges Costa², Bruna Leticia Devidé Ribeiro¹, Marina Gea Peres¹, Wanderson Sirley Teixeira¹, Vanessa Cristina Pelicia¹, Marcelo Bahia Labruna³, Karim Sidi-Boumedine⁴, and Jane Megid^{1,*}.

¹Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

²Universidade Estadual do Maranhão, UEMA, São Luís, MA, Brasil

³ Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brazil.

⁴Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, Sophia-Antipolis, France.

*Correspondence author: email: jane@fmvz.unesp.br, phone: +55(14)3880-2109

Abstract

In the past few years, some cases of Q fever has been described in Brazil but the epidemiological situation in ruminants, the main reservoir of the pathogen, is still not well understood. The aim of this study is to evaluate the prevalence of *C. burnetii* in cattle and its implication in a public health perspective. For this, 1515 serum of bovines collected in several slaughterhouses were analyzed by immunofluorescence assay (IFA) and real-time PCR (qPCR) for the presence of the pathogen. Three hundred and sixty-four 23.8% [CI95%= 21.7% – 25.9%] samples were positive in imunodiagnosis indicating the exposure to *C.*

burnetii. IFA positive samples were submitted to qPCR and 25.6% (CI95% 21.4% – 30.1%) (92/360) of the seropositive samples were also positive at molecular detection with an average of 133 bacteria/mL, indicating the presence of the bacteria in the bloodstream of those animals in the moment of slaughter. Here we demonstrate a widespread distribution of the pathogenic agent of Q fever in the state of São Paulo, Brazil. Moreover, the detection of *C. burnetii* in the bloodstream during the slaughter represents a risk for abattoir workers due to the low infective dose of this agent, and the formation of aerosol during slaughter procedures.

Keywords: Cattle, *Coxiella burnetii*, Public Health, Q fever, Slaughterhouses, Zoonosis.

Introduction

Coxiella burnetii is the causative agent of Q fever in humans and animals [1,2], a disease that has a worldwide distribution, with exception of New Zealand [1,3]. It is an obligatory intracellular, gram-negative bacterium, that can persist in the environment for long periods due to the morphological form of small cell variant (SCV), a spore-like form highly infective [3].

In humans, Q fever is mainly asymptomatic, but an acute form with flu-like syndromes, acute hepatitis, and pneumonia, or a chronic and more severe form of the disease with focalized infection, such endocarditis or vascular infections, are also possible outcomes [2,4]. *C. burnetii* is mainly transmitted by inhalation of aerosol particles and through exposure in the vicinity of infected animals, their reproductive tissues or other animal products [1], but people who live far from livestock production also can acquire the disease through the inhalation of particles transported by wind for long distances [5,6].

In animals, coxiellosis is most often latent, with the persistent shedding of bacteria into the environment [7]. *C. burnetii* can infect a diverse group of species ranging from

arthropods and cold blood animals to birds and mammals [1,3], but domestic ruminants are considered the main reservoirs for the disease in humans [8]. In cows, ewes, and goats, the disease is associated with late abortion and reproductive disorders, and in cows, it is suggested a link with metritis and infertility [1].

Regarding the diagnosis in ruminants, no gold standard is available, although the detection and quantification through real-time PCR (qPCR) and serological enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are considered the methods of choice for clinical and epidemiological diagnose [1]. For serological diagnose of Q fever in animals, the most common techniques are indirect immunofluorescence (IFA) test, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and complement fixation test (CFT), with a preference for the use of ELISA due to practical reasons and also to its higher sensitivity [1]. The presence of specific IgG antibodies provides evidence of a recent *C. burnetii* infection or a past exposure. The lipopolysaccharide (LPS) is the main antigen of *C. burnetii* and is found in two different phases in the surface of the bacterium. Phase I antigen is the complete form of the LPS and is linked to the virulent form of the pathogen. Phase II antigen is the truncated form and is the result of gene deletion and consequent loss of some sugars in the composition of the LPS [8]. Serological antigens are based on this two antigenic forms of *C. burnetii* [1]. Phase II is immunodominant and is inserted in phase I LPS, and for this reason antibodies anti-phase II are always present during the course of infection, this feature is important for epidemiological studies where the detection of phase II antibodies is preferable [9].

The apparent prevalence is slightly higher in cattle, around 20% for animal and 37.7% for the herd than in small ruminants where it varies in average about 15% and 25%, respectively, for animals and herds [10]. In Brazil, just a few epidemiological surveys aimed to establish the seroprevalence in cattle. In 1955, Valle, Brandão, Cristovão, & D'Apice [11] found 14% (24/171) of positivity in dairy cows. Later, Riemann, Brant, Behymer & Franti [12]

reported 29% (45/156) of seroprevalence in beef cattle. And recently, a survey using a commercial ELISA found 55.1% (172/312) of seropositivity in goats with reproductive disorders [13].

Q fever can be considered an occupational hazard for farmers, veterinarians and abattoir workers [7]. Since it was described in Australia, in 1937, epidemic Q fever has been predominantly associated with abattoirs in that country until 1980, where in some regions 92% of cases of the disease were among slaughterhouse workers [14,15]. In France, an outbreak of Q fever that affected 204 people from Briançon had as a source of infection a slaughterhouse [16,17]. In Brazil, a survey reported 29% (41/144) of seroprevalence for *C. burnetii* among slaughterhouse workers, with higher positivity for those who work in the corrals (40%) and in the killing floor (36%) [12], and in 2015, one outbreak related to slaughterhouse workers was reported in the city of Barbosa (21°16'0"S 49°56'54"W), state of São Paulo [18].

Due to the lack of epidemiological survey in Brazil regarding the prevalence of *C. burnetii* in the main reservoirs, and the risk of acquired Q fever during the slaughter of animals, posing a risk to the health of workers, the aim of this study was to establish the prevalence of *C. burnetii* in beef cattle in Brazil using serological and molecular method of diagnosis.

Materials and Methods

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA-FMVZ-UNESP/Botucatu, state of São Paulo), Brazil, protocol number 0203/2016.

Samples

Serum samples were obtained from nine slaughterhouses in the state of São Paulo, Brazil. The sample size was calculated using the proportion test of Openepi [19]. To estimate the number of bovines to be tested through IFA, it was considered the slaughter population of São Paulo state of 3.5 million bovines per year [20]. As the real situation of the disease is unknown, we used an apparent prevalence of coxiellosis of 50% with 3% precision and a confidence interval of 95%.

Immunofluorescence assay

Serum samples were defrosted and analyzed by immunofluorescence assay (IFA) according to Horta et al. [21]. For IFA assay, we used slides containing *C. burnetii* phase I antigen produced at the laboratory of FMVZ/USP. The in house antigen was produced from the Argentina strain of *C. burnetii* isolated from ticks [22].

For serological analysis, all slides used during the assay were assembled as follows: 20 μ L of serum samples were placed in the wells previously prepared with the antigen and incubated for 30 minutes at 37°C. Then the slides were washed with washing buffer (WB) and placed for 10 minutes in a vat containing WB solution; this operation was repeated twice. Subsequently, the slides were dried at 37°C for 10 minutes. The material was organized in a humid chamber and 20 μ L of the bovine conjugate was added and incubated for 30 minutes at 37°C. After incubation, slides were washed with WB and deposited in a vat containing WB solution and 1.5 ml of the Evans solution for 10 minutes (step repeated twice). Slides were dried and read under a fluorescence microscope. In each slide, positive and negative sera were used as controls. Reactive sera at the 1:64 dilution, (screening dilution) were tested in

subsequent serial dilutions (1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048 ...) to determine the final reaction titre.

Real-time PCR

All samples that showed a positive reaction for IFA were screened through real-time PCR using a melt analysis protocol in Brazil. For quantification purposes, qPCR using specific probes for *C. burnetii* was performed at the Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES, Sophia-Antipolis, France), the World Organization for Animal Health (OIE) reference laboratory for Q fever.

Extraction of serum samples was carried out with Blood and Tissue Kit (Quiagen®) using the manufacture protocol. Briefly, 200µL of serum was added to 180µL of ATL buffer and 20µL of proteinase K and incubated for 30 minutes at 70°C. After, 200 µl of ethanol (96–100%) was added to the sample and mixed thoroughly. Samples were pipet into the DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube, centrifuged at 6000 x g for 1 min, and the flow-through discarded. We added 500 µl Buffer AW1, and centrifuge for 1 min at 6000 x g with the flow-through discarded again. To complete the cleaning of the sample, 500 µl of buffer AW2 was added and centrifuged for 3 min at 20,000 x g to dry the DNeasy membrane. Finally, we put the column in a clean 1.5 ml tube, and pipet 200 µl of elution buffer directly onto the DNeasy membrane. Samples were then Incubate at room temperature for 1 min, and centrifuge for 1 min at 6000 x g to elute.

The melt-analysis protocol was performed according to Vaidya et al.[23] with primers Trans 3 (5'-GTAACGATGCGCAGGCGAT-3') and Trans 4 (5'-CCACCGCTTCGC TCGCTA-3') previously described [24]. Briefly, the PCR reaction was run in a total volume of 20 µL, containing 5 pMol of each forward and reverse primer, 10 µL BRYT GreenTM Dye GoTaqTM qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 7 µL nuclease-free PCR grade

water, and 2 μ L of DNA template. The qPCR assay was performed in a Real-Time Applied BiosystemsTM Step-One (model ABI 7500 Fast), with the standard cycle of 95°C/10 minutes, and 40 cycles comprising 94°C/30sec, 61°C/30sec, 72°C/1min. Fluorescence was recorded at the end point of each cycle, and dissociation curve analysis consisting of 95°C/30sec, followed by 61°C/30s and gradual increment to 95°C at 2°C/min. As a positive control, we used an extracted DNA from *C. burnetii* strain isolated from Argentina ticks [22] that after completion of the dissociation curve recorded the temperature of melt (T_m) of 86.91°C.

For quantification of *C. burnetii* in the samples and also for confirmation of the results obtained with the melt protocol, qPCR with specific primers and probes developed by the reference center was used. Briefly, the PCR reaction was performed in a total volume of 25 μ l containing 320nM of each forward and reverse primers, 200nM of the specific probe (FAM-TAMRA), 1X of Taqman Universal PCR Master mix (Applied Biosystems), 5.7 μ L nuclease-free PCR grade water, and 5 μ L of DNA template. As control of the extraction, 320 nM of primers targeting glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene of ruminants and 200nM of a probe (VIC-TAMRA) were used. All assays were analyzed in CFX96TM equipment (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Cycling conditions were composed of 50°C/2 min, 95°C/10min, and 40 cycles of 95/15sec, 60°C/1 min. The fluorescence was recorded at the end of each cycle. In order to quantify the samples, in each assay, a standard containing decimal dilution (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , and 10^2) of *Coxiella burnetii* strain Nine Mile was used, and as a quality control of the assay, two sentinels samples containing a concentration of 10^4 of Nine Mile isolate was also used.

Sequencing

To confirm the detection of *C. burnetii*, some positive samples at qPCR were analyzed by 1% agarose gel and purified with Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Inc.). Quantification of the purified products was performed using a Nanodrop (Thermo Fischer). BigDye® Terminator Sequencing Reaction v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied) and precipitation reaction by Ethanol / EDTA / Sodium Acetate. Automatic sequencing by capillary electrophoresis on the ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) and alignment of the nucleotide sequences produced with the reference sequences deposited in GenBank. PCR product was also confirmed by 1.5% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide to visualize a 243 bp product.

Georeferencing

All evaluated samples were spatially distributed in the cities sampled during work and analyzed through thematic density maps with ArcGIS 10.0 [25]. We create three thematic maps of sample distribution concerning i) total number of samples, ii) the number of positive samples in serology by IFA, and iii) number of positive serum samples in real-time PCR analysis.

Prevalence was calculated in two steps. First, an apparent prevalence was calculated for both diagnostic tests. Then, a real prevalence was calculated considering the sensibility and specificity previous reported to IFA [26] in ruminants and to qPCR in serum [27,28]. For statistical analysis, positive samples were those positive for IFA and qPCR. All statistical analysis takes into account a confidence interval of 95% and were performed with “epiR” [29] in the R environment [30].

Results

The apparent prevalence of antibodies against *C. burnetii* was 23.8% [CI95% = 21.7% – 25.9%] (360/1515) in the IFA test and 25.6% [CI95% = 20.1% – 28.8%) (92/360) in qPCR. The true prevalence was calculated as 20.0% [IC95% = 17.8 – 22.3%] and 28.7% [IC95%=23.8% – 34.1%], to IFA and qPCR, respectively (Table 1). When the prevalence was stratified by slaughterhouses, it was demonstrated a homogenous positivity for *C. burnetii* since all plants had positive samples in both diagnostic methods (Table 2) and no statistical difference was observed using Chi-Squared ($p>0.05$). Due to a large number of positive samples in the melt analysis protocol, some samples were confirmed as *C. burnetii* through sequencing (GenBank accession number MK125016-MK125022), and the remaining of the positive samples detected by melt analysis were confirmed using specific probes during quantification step. Quantification of the positive serum samples showed in average 133 bacteria/mL of serum, with a minimum of 10 bacteria and maximum of 814 bacteria per mL.

Table 1. Apparent prevalence and true prevalence considering the sensibility and specificity for IFA and qPCR with a 95% confidence interval.

Prevalence	n/total	%	95%CI
Apparent prevalence for IFA	360/1515	23.8%	21.7% – 25.9%
True prevalence for IFA		20.0%	17.8% – 22.3%
Apparent prevalence for qPCR	92/360	25.6%	20.1% – 28.8%
True prevalence for qPCR		28.7%	23.8% – 34.1%

Table 2. Prevalence for each slaughterhouse evaluated during the study in IFA and qPCR.

IFA				PCR		
Slaughterhouse	Positives (n)	Samples analyzed (n)	Prevalence (%)	Positives (n)	Samples analyzed (n)	Prevalence (%)
1	42	170	24.7%	20	59	33.9%
2	38	166	22.9%	14	39	35.9%
3	29	170	17.0%	5	29	17.2%
4	49	170	28.8%	14	48	29.2%
5	64	181	35.3%	6	65	9.2%
6	27	158	17.1%	16	27	59.2%
7	42	162	25.9%	6	43	25.9%
8	21	172	12.2%	2	21	9.5%
9	48	166	28.9%	9	48	18.7%
Total	360	1515	23.8%	92	360	25.6%

The construction of density maps allowed to observe that *C. burnetii* is circulating across the state of São Paulo, since we have positivity in serological and molecular diagnosis in all regions sampled (Figures 2, 3, and 4).

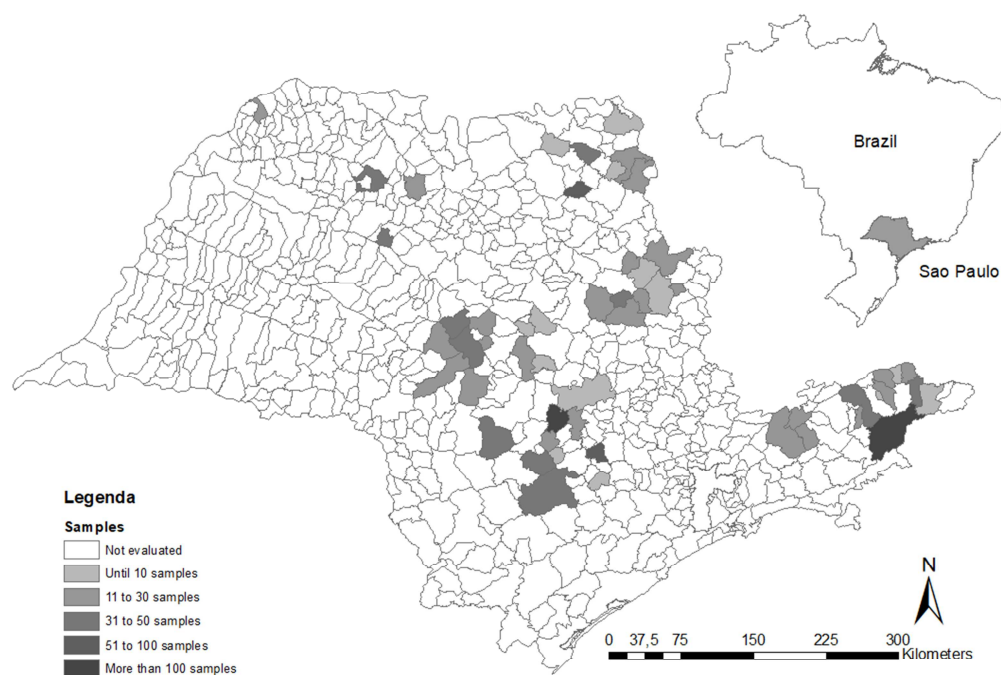


Figure 2. Distribution of serum samples by municipalities.

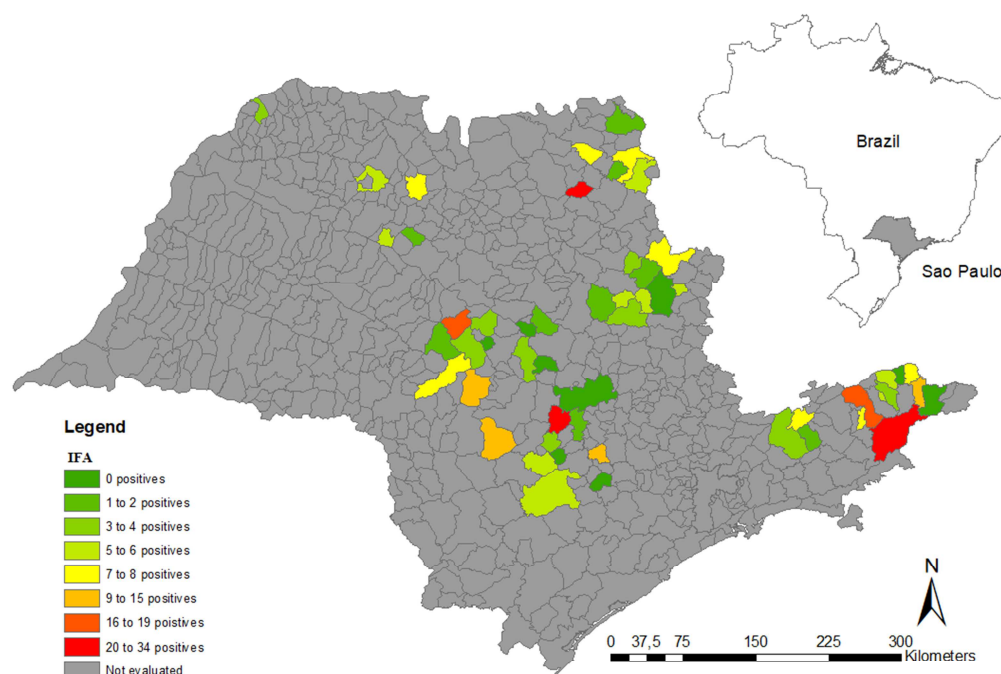


Figure 3. Distribution of seropositive animals in Imunofluorescence assay (IFA).

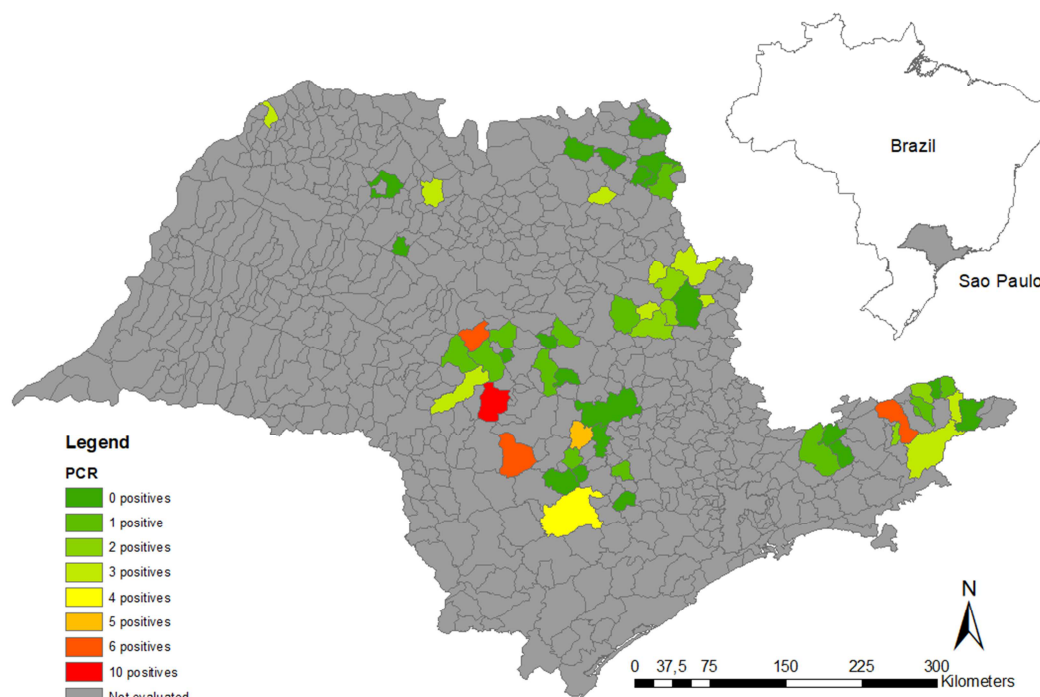


Figure 4. Detection of *Coxiella burnetii* DNA in different municipalities.

Discussion

During the study, *C. burnetii* was diagnosed with serological and molecular methods in beef cattle sent to slaughter. The circulation of the bacteria could be verified through IFA in 360 samples (23.8% [CI95% = 21.7%–25.9%]), indicating past or current infection, and the presence of the pathogen in the bloodstream of beef cattle in the moment of slaughter was confirmed using qPCR in 92 seropositive animals (25.6% [CI95% = 20.1%–28.8%]). The true prevalence was calculated in 20.0% and 28.7%, for IFA and qPCR, respectively.

In several countries, the use of serological diagnosis in slaughterhouses was the primary method of surveillance for zoonotic diseases. The efficiency of this approach relies on the existence of a traceability system, being useful for detection and monitoring pathogens

in regions with relatively high prevalence [31]. Sampling in abattoirs has some advantages when the prevalence of a disease is unknown, such as the sampling of a large number of animals from different cities, regions, and producers in a short time. Although the results can provide insights about the prevalence in a population it truly reflects the reality for the slaughter population and the population of the regions sampled instead of the absolute population. Moreover, some pathogens have specific characteristics of infection, such as the preference for sex or age, or the influence of type of production (extensive *versus* intensive) [32]. Therefore, based on those observations, results obtained from samples taken at slaughterhouses can be corrected for age and sex to estimate the prevalence in the living population if necessary, for example, if differences in prevalence are expected in different age categories.

Slaughter population is mainly composed by healthy males, and because of this, our results estimate the infection of *C. burnetii* in cattle rather than the prevalence of coxiellosis itself, since most animals are asymptomatic for the disease and the main clinical sign is related to reproductive disorders [1,33,34], a feature that cannot be assessed inside the abattoirs due to the small period of observation and also because the majority of animals slaughtered are males. The evaluation of females from herds experiencing abortions can lead to higher rates of prevalence as it was observed in the northeast of Brazil where 55.1% of the goats were positive for *C. burnetii* [13]. Also, in Japan, To et al., [35] reported 58.9% and 60.4% of antibodies anti-phase I and anti-phase II respectively, in dairy cattle with reproductive disorders.

The true prevalence of 20.0% found in the serological analysis using IFA, although less than the median prevalence for herd cattle of 37.7% [10] is still considered high. Our result is similar to the previous study in slaughterhouses in Brazil [12] where the prevalence assessed using CFT was 29%. In India, researchers reported 7.1% of positivity for *C. burnetii*

in slaughtered cattle [36], and in Trinidad, a seroprevalence of 4.3% was reported in slaughtered bovines [37]. In contrast, a study conducted in Western Australia used a commercial Q fever ELISA developed in Europe and CFT and reported very low numbers of positive samples with ELISA (2/329) and none positive reaction in CFT in beef cattle [38]. Unlike, beef cattle from Queensland presented 16.8% of positivity in ELISA when tested with an antigen produced from an Australian isolate of *C. burnetii* [39].

The outcome of serology diagnosis can have influence of the antigen used since several features can interfere in the sensibility and specificity of the serodiagnosis, such as the use of whole cell antigen, lysates or chemical extracts, and also the strain used, once it is possible the presence of antigenic differences between isolates from different regions [39]. Studies comparing antigens produced from Nine Mile strain, an ovine strain, and ruminants strains, reported better efficiency in sensibility and specificity for those using ovine and ruminant strains [40,41]. In addition, phase II LPS is the immunodominant antigen and is inserted in phase I LPS, so antibodies against phase II are always present during the infection and are more indicated for epidemiological studies [9,42]. In our study, we used an in house antigen produced from a *C. burnetii* strain isolated from ticks in Argentina. Since this strain still didn't have passed through several passages in cells culture and it's mainly composed by phase I cells, our results can be even higher because antibodies against phase II must be underestimated. In addition, the use of Argentinian strain can pose an impact in the outcome as well.

The serological evidence of *C. burnetii*, although expresses a recent or past exposure to the pathogen does not indicate that an active infection is ongoing and so cannot infer an actual hazard for slaughterhouses workers, but the detection by qPCR in 25.6% [CI95% = 20.1%–28.8%] of the seropositive samples demonstrates the presence of the pathogen in the moment of slaughter. The use of qPCR in human sera to detected *C. burnetii* is essential for

the diagnosis of acute Q fever [27,43]. In animals, only a few studies reported the use of molecular diagnosis in serum samples. To et al. [35], using nested PCR, reported 3.9% of *C. burnetii* in serum from dairy cows with reproductive disorders. During a storm of abortion in goats, 20 serum samples were tested using qPCR and the DNA of the pathogen was detected in 12 samples wherein 10 seropositives and 2 seronegative in CFT [44].

The use of molecular diagnosis in sera was also used to reveal the source of a human's infection in Japan, where 2 human patients, 2 dogs, and 3 cats were positive using nested PCR. Sequence analysis of the humans and the dogs showed a high degree of similarity and all four isolates contained the QpH1 plasmid. Moreover, the authors were able to isolate *C. burnetii* from the serum samples, demonstrating the presence of viable bacteria in serum samples and, for consequence, in the bloodstream [45]. The isolation of *C. burnetii* using serum from humans with acute Q fever was also recently performed in Australia using cell culture [46], corroborating with the presence of viable bacteria in serum and blood.

The main route of transmission of Q fever is through inhalation of infectious particles. The presence of *C. burnetii* in the bloodstream was evidenced by quantitative qPCR from serum samples, ranging from 10 to 814 bacteria/mL (average of 133 cells/mL). As *C. burnetii* is an intracellular pathogen [3], in the whole blood of the slaughtered cattle must have many more bacteria per milliliter than the recorded number in serum samples. The results exposed here evidence the risk of infection for slaughterhouses workers once aerosols may be produced during slaughter procedures such as bleeding, sawing of half-carcasses, among others [47]. Those facts emphasize the risk of acquiring Q fever due to the contact with blood from infected animals, a possibility that increases inside abattoirs due to the formation of aerosols from slaughter procedures and the low infective dose of *C. burnetii* for humans, between 1 to 10 bacteria [47,48]. It also represents a threat for people who live in the surrounding areas of livestock production once those animals can shed the bacteria in the

environment leading to a possible dissemination of the *C. burnetii* to urban areas through the wind for long distances [5,6].

Conclusion

Detection of *C. burnetii* in cattle sent to slaughter in 23.8% [IC95% = 21.7%–25.9%] and 25.6% [IC95% = 21.2%–30.4%] of the samples using, respectively, serological and molecular diagnosis indicate that the pathogen is widely prevalent in in herds of the state of São Paulo. Moreover, the graphical distribution of the positive samples for both diagnostic tests revealed the presence of the bacteria in all regions sampled, indicating that the infection of cattle by *C. burnetii* is not restricted to a single region. These results expresses a risk for public health since *C. burnetii* is an airborne pathogen and can be spread by wind to long distances, causing outbreaks of Q fever in cities close to livestock production. In addition, an occupational hazard for farmers, veterinarians, and especially abattoirs workers, has to be highlighted due to the low infective dose of *C. burnetii* for humans. Surveillance programs for humans and animals should be implemented in Brazil to monitor cases of Q fever and to establish preventive and control measures.

Acknowledgments

For the Ministry of Agriculture and Livestock Supply of Brazil, the Secretary of Agriculture of the State of São Paulo, and all the prefectures that collaborated for this work.

References

1. OIE. Q Fever. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Paris: World Organisation for Animal Health; 2018. pp. 1–18. Available: <http://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>

2. Anderson A, Bijlmer H, Fournier P-E, Graves S, Hartzell J, Kersh GJ, et al. Diagnosis and management of Q fever--United States, 2013: recommendations from CDC and the Q Fever Working Group. *MMWR Recomm Rep*. 2013;62: 1–30. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23535757>

3. Marrie TJ, Minnick MF, Textoris J, Capo C, Mege J-L. *Coxiella*. In: Tang Y-W, Sussman M, Liu D, Poxton I, Schwartzman J, editors. *Molecular Medical Microbiology*. Second. Elsevier; 2015. pp. 1941–1972. doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00106-2

4. Raoult D. Rickettsial Infections. In: Goldman L, Schafer AI, editors. *Goldman's Cecil Medicine*. 24th ed. Elsevier; 2012. pp. 1954–1964. doi:10.1016/B978-1-4377-1604-7.00335-3

5. Tissot-dupont H, Amadei M, Nezri M, Raoult D. Wind in November , Q fever in December. *Emerg Infect Dis*. 2004;10: 1264–1269. doi:10.3201/eid1007.030724

6. Hawker JJ, Ayres JG, Blair I, Evans MR, Smith DL, Smith EG, et al. A large outbreak of Q fever in the West Midlands: windborne spread into a metropolitan area? *Commun Dis Public Heal*. 1998;1: 180–187. Available: https://www.researchgate.net/profile/Jon_Ayres/publication/13502962_A_large_outbreak_of_Q_fever_in_the_West_Midlands_windborne_spread_into_a_metropolitan_area/links/09e4150c05597897c9000000/A-large-outbreak-of-Q-fever-in-the-West-Midlands-windborne-spread

7. Maurin M, Raoult D. Q Fever. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12: 518–553. doi:10.1128/CMR.12.4.518

8. Toman R, Heinzen RA, Samuel JE, Mege J-L. *Coxiella burnetii*: Recent Advances and

- New Perspectives in Research of the Q Fever Bacterium [Internet]. 1st ed. Toman R, Heinzen RA, Samuel JE, Mege J-L, editors. Advances in Experimental Medicine and Biology. Dordrecht: Springer Netherlands; 2012. doi:10.1007/978-94-007-4315-1
9. Rousset É, Cremoux R de, Bronner A, Jourdain E, Touratier A, Sidi-Boumedine K. La fièvre Q. Bull des GTV - Hors Série “Zoonose Mal bactériennes.” 2012; 53–67.
 10. Guatteo R, Seegers H, Taurel AF, Joly A, Beaudeau F. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: A critical review. Vet Microbiol. 2011;149: 1–16. doi:10.1016/j.vetmic.2010.10.007
 11. Valle LAR, Brandão H, Cristovão D de A, D’Apice M. Investigações sobre a Febre Q em São Paulo . 2. Estudos em tratadores de gado e em bovinos. Arq Fac Hig Saude Publica Univ Sao Paulo. 1955;9: 167–180.
 12. Riemann HP, Brant PC, Behymer DE, Franti CE. Toxoplasma gondii and *Coxiella burnetii* antibodies among Brazilian slaughterhouse employees. Am J Epidemiol. 1975;102:386–393.Available:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1200023
 13. de Oliveira JMB, Rozental T, de Lemos ERS, Forneas D, Ortega-Mora LM, Porto WJN, et al. *Coxiella burnetii* in dairy goats with a history of reproductive disorders in Brazil. Acta Trop. Elsevier; 2018;183: 19–22. doi:10.1016/j.actatropica.2018.04.010
 14. Spelman DW. Q fever: A study of 111 consecutive cases. Med J Aust. 1982;1: 547–553. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2
 15. Derrick EH. The course of infection with *Coxiella burnetii*. Med J Aust. 1973;1:1051-1057.

16. Armengaud A, Kessalis N, Desenclos JC, Maillot E, Brousse P, Brouqui P, et al. Urban outbreak of Q fever, Briançon, France, March to June 1996. *Eurosurveillance*. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC); 1997;2: pii=137. Available: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=137>
17. Tissot-Dupont H, Torres S, Nezri M, Raoult D. Hyperendemic focus of Q fever related to sheep and wind. *Am J Epidemiol*. 1999;150: 67–74. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a009920
18. CIEVS. Informe Epidemiológico Cievs – Paraná. Semana Epidemiológica. Curitiba: Centro de Informações e Respostas Estratégicas de Vigilância em Saúde – CIEVS; 2015. Available: www.saude.pr.gov.br
19. Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health. In: Versão. www.OpenEpi.com [Internet]. 2013 [cited 23 Aug 2016]. Available: http://openepi.com/Menu/OE_Menu.htm
20. Bueno CRF. Produção Animal : Estado de São Paulo e Brasil , 2005 a 2014. Análises e indicadores do Agronegócio. 2016;11: 1–6. Available: <http://www.iea.sp.gov.br/out/LerTexto.php?codTexto=14035>
21. Horta MC, Labruna MB, Sangioni LA, Vianna MCB, Gennari SM, Galvão MAM, et al. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the state of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever gro. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;71: 93–7. doi:10.4269/ajtmh.2004.71.93
22. Pacheco RC, Echaide IE, Alves RN, Beletti ME, Nava S, Labruna MB. *Coxiella burnetii* in ticks, Argentina. *Emerg Infect Dis*. 2013;19: 344–6.

doi:10.3201/eid1902.120362

23. Vaidya VM, Malik SVS, Bhilegaonkar KN, Rathore RS, Kaur S, Barbuddhe SB. Prevalence of Q fever in domestic animals with reproductive disorders. "Comparative Immunol Microbiol Infect Dis. Elsevier Ltd; 2010;33: 307–321. doi:10.1016/j.cimid.2008.10.006
24. Hoover TA, Vodkin MH, Williams JC. A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. J Bacteriol. 1992;174: 5540–8. doi:10.1128/jb.174.17.5540-5548.1992
25. ESRI. ArcGIS Desktop: Release 10. Redlands, CA: Environmental Systems Research Institute. Redlands CA. 2011.
26. Slabá K, Skultéty L, Toman R. Efficiency of various serological techniques for diagnosing *Coxiella burnetii* infection. Acta Virol. 2005;49: 123–7. doi:10.1126/science.285.5427.546
27. Schneeberger PM, Hermans MHA, van Hannen EJ, Schellekens JJA, Leenders ACAP, Wever PC. Real-time PCR with serum samples is indispensable for early diagnosis of acute Q fever. Clin Vaccine Immunol. 2010;17: 286–90. doi:10.1128/CVI.00454-09
28. Turra M, Chang G, Whybrow D, Higgins G, Qiao M. Diagnosis of acute Q fever by PCR on sera during a recent outbreak in rural South Australia. Annals of the New York Academy of Sciences. 2006. pp. 566–569. doi:10.1196/annals.1374.112
29. Stevenson M, Nunes T, Heuer C, Marshall J, Sanchez J, Thornton R, et al. epiR: Tools for the Analysis of Epidemiological Data. R package version 0.9-96. [Internet]. 2018. Available: <https://cran.r-project.org/web/packages/epiR/index.html>

30. R Core Team. R: The R Project for Statistical Computing. In: R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [Internet]. 2017. Available: <https://www.r-project.org/>
31. Nielsen K, Duncan JR. Animal Brucellosis. Second. Nielsen K, Duncan JR, editors. Florida: CRC Press; 1990.
32. May RM, Anderson RM. Population biology of infectious diseases: Part II. Nature. 1979;280: 455–61. doi:10.1088/1751-8113/44/8/085201
33. Bildfell RJ, Thomson GW, Haines DM, McEwen BJ, Smart N. *Coxiella Burnetii* Infection is Associated with Placentitis in Cases of Bovine Abortion. J Vet Diagnostic Investig. 2000;12: 419–425. doi:10.1177/104063870001200505
34. Agerholm JS. *Coxiella burnetii* associated reproductive disorders in domestic animals-a critical review. Acta Vet Scand. 2013;55: 13. doi:10.1186/1751-0147-55-13
35. To H, Htwe KK, Kako N, Kim HJ, Yamaguchi T, Fukushi H, et al. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle with reproductive disorders. J Vet Med Sci. 1998;60: 859–61. doi:10.1292/jvms.60.859
36. Agrawal JP, Negi SK. Studies on the prevalence of Q-fever antibodies and comparative evaluation of serological techniques for their detection in animal and human sera. Indian J Comp Microbiol Immunol Infect Dis. 1983;4: 212–214.
37. Adesiyun AA, Cazabon EPI. Seroprevalences of brucellosis, Q-fever and toxoplasmosis in slaughter livestock in Trinidad. Rev Elev Med Vet Pays Trop. 1996;49:28–30. Available: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=lah&AN=19972204658&lang=fr&site=ehost-live>

38. Banazis MJ, Bestall AS, Reid SA, Fenwick SG. A survey of Western Australian sheep, cattle and kangaroos to determine the prevalence of *Coxiella burnetii*. Vet Microbiol. 2010;143: 337–345. doi:10.1016/j.vetmic.2009.12.002
39. Cooper A, Hedlefs R, McGowan M, Ketheesan N, Govan B. Serological evidence of *Coxiella burnetii* infection in beef cattle in Queensland. Aust Vet J. 2011;89: 260–264. doi:10.1111/j.1751-0813.2011.00794.x
40. Horigan MW, Bell MM, Pollard TR, Sayers AR, Pritchard GC. Q fever diagnosis in domestic ruminants: comparison between complement fixation and commercial enzyme-linked immunosorbent assays. J Vet Diagn Invest. 2011;23: 924–31. doi:10.1177/1040638711416971
41. EFSA. European Food Safety Authority panel on animal health and welfare: 2010, Scientific opinion on Q fever. EFSA J. 2010;8: 1–114. doi:10.2903/j.efsa.2010.1595.
42. O'Neill TJ, Sargeant JM, Poljak Z. A Systematic Review and Meta-Analysis of Phase I Inactivated Vaccines to Reduce Shedding of *Coxiella burnetii* From Sheep and Goats From Routes of Public Health Importance. Zoonoses Public Health. 2013;61: n/a-n/a. doi:10.1111/zph.12086
43. Wielders CCH, Wijnbergen PCA, Renders NHM, Schellekens JJA, Schneeberger PM, Wever PC, et al. High *Coxiella burnetii* DNA load in serum during acute Q fever is associated with progression to a serologic profile indicative of chronic Q fever. J Clin Microbiol. 2013;51: 3192–8. doi:10.1128/JCM.00993-13
44. Emery MP, Ostlund EN, Ait Ichou M, Ballin JD, McFarling D, McGonigle L. *Coxiella burnetii* serology assays in goat abortion storm. J Vet Diagn Invest. 2014;26: 141–5. doi:10.1177/1040638713517233

45. Komiya T, Sadamasu K, Toriniwa H, Kato K, Arashima Y, Fukushi H, et al. Epidemiological survey on the route of *Coxiella burnetii* infection in an animal hospital. J Infect Chemother. Elsevier; 2003;9: 151–5. doi:10.1007/s10156-003-0237-7
46. Vincent GA, Graves SR, Robson JM, Nguyen C, Hussain-Yusuf H, Islam A, et al. Isolation of *Coxiella burnetii* from serum of patients with acute Q fever. J Microbiol Methods. Elsevier B.V.; 2015;119: 74–8. doi:10.1016/j.mimet.2015.10.008
47. Kaufmann AF, Fox MD, Boyce JM, Anderson DC, Potter ME, Martone WJ, et al. Airborne spread of brucellosis. Ann N Y Acad Sci. 1980;353: 105–114. doi:10.1111/j.1749-6632.1980.tb18912.x
48. Jones RM, Nicas M, Hubbard AE, Reingold AL. The Infectious Dose of *Coxiella Burnetii* (Q Fever). Appl Biosaf. 2006;11: 32–41. doi:10.1177/153567600601100106

CAPÍTULO 4 – FIRST REPORT OF *Coxiella burnetii* IN THE ABORTED FETUSES FROM CATTLE IN BRAZIL.

Theriogenology - (<https://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691x/guide-for-authors>)

Authors: Mateus de Souza Ribeiro Mioni^a, Karim Sidi-Boumedine^b, Wanderson Sirley Reis Teixeira^a, Vanessa Cristina Pelícia^a, Bruna Letícia Davidé Ribeiro^a, Marcelo Bahia Labruna^c, Jane Megid^{a,*}.

Affiliations:

^a Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Distrito de Rubião Júnior s/n, 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brazil.

^b Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l’Alimentation, de l’Environnement et du Travail, 105, route des Chappes, 06902, Sophia-Antipolis, France.

^c Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando M. de Paiva, 87, 05508-270, São Paulo, Brazil.

***Corresponding author:** Tel: +55 14 38802109, FAX: +55 14 3880-2090, e-mail address: jane.megid@unesp.br (J. Megid)

Abstract

In the past decade, cases of Q fever have been described in Brazil. Although the detection of *Coxiella burnetii* in human cases and animals were described, is poorly the knowledge about this pathogen regarding livestock in Brazil. The aim of the study was to detect, by quantitative real-time PCR, *C. burnetii* in the fetus of cattle, due to the importance

of the bovine as reservoirs. From 28 samples analyzed, 10.7% (n=3) were positive with a significant bacterial concentration up to 10^4 . Our results strongly support *C. burnetii* as the causative agent of the abortions. This is the first report confirming the involvement of *C. burnetii* in abortion episodes from cattle in Brazil, indicating that this pathogen can cause economic losses due to abortion and reproductive disorders. *C. burnetii* should be included in the list of abortive pathogens for livestock in Brazil, and also in the surveillance for human health due to the massive dispersion of the pathogen during delivery of ill animals.

Key words: *Coxiella burnetii*, Q fever, Abortion, Cattle, Public Health.

1. Introduction

Coxiella burnetii is the causative agent of Q fever in humans and animals [1,2], a disease that has a worldwide distribution, with exception of New Zealand [1,3]. It is an obligatory intracellular, gram-negative bacterium, that can persist in the environment for long periods due to the morphological form of small cell variant (SCV), a spore-like form that is highly infective [3].

In animals, coxiellosis is most often latent, with the persistent shedding of bacteria into the environment [3]. Domestic ruminants are considered the main reservoirs for the disease in humans [2], and in cows, ewes, and goats, the disease is associated with abortion and reproductive disorders. Besides, in cows, it is suggested a link with metritis, placentitis, and infertility [1,4,5]. The infection of the fetus occurs via the amniotic-oral route leading to fetal bronchopneumonia, and the outcome of an intrauterine infection with *C. burnetii* depends on the gestation stage, strain virulence, maternal and fetal immune responses, the severity of placental infection and lesions, and spread to the fetus [5]. Evidence of abortion in ruminants is of public health concern since animals can shed the pathogen in birth products in

a concentration up to 10^9 , and the dose of infection for humans is around 1–10 bacteria transmitted through inhalation [1,3,6,7].

Because *C. burnetii* can be shed by asymptomatic animals [5], the detection of the bacteria in vaginal swabs and placenta is not sufficient to abortive diagnosis, and to confirm the involvement the pathogen in episodes of abortion it is necessary a quantitative result of at least 10^4 bacteria per gram of placenta or vaginal swabs associated with symptoms and serology [1,8]. If the detection relies on the aborted fetus, a positive result, above the limit detection of the method, in tissues or stomach contents by quantitative qPCR is sufficient to diagnose Q fever as the origin of abortion [8].

The aims of this study were the detection of *C. burnetii* in the bovine fetuses and discuss the involvement of this pathogen in abortions episodes since the situation of coxiellosis in livestock in Brazil is still not well understood.

2. Materials and methods

2.1. Ethics

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA-FMVZ-UNESP/Botucatu, state of Sao Paulo), Brazil, protocol number 0203/2016.

2.2. Samples

A retrospective survey was carried out in 28 extracted DNA from fetuses samples (pool of organs, gastric content and brain), derived from the laboratory of molecular diagnosis of São Paulo State University (FMVZ/UNESP) Brazil over 2013 to 2017, for the detection and quantification of *Coxiella burnetii*.

2.3. Molecular diagnosis

2.3.1. DNA extraction

All DNA extraction was performed with Invisorb™ Spin Tissue mini kit (Invitek, (Invitek, STRATEC Biomedical, Germany) following the manual procedures of the manufacturer.

2.3.2. Melt analysis protocol

For screening of the samples, qPCR targeting the multi-copy gene *IS1111* was performed using melt analysis according to Vaidya et al.[9] with primers Trans 3 (5'-GTAACGATGCGCAGGCGAT-3') and Trans 4 (5'-CCACCGCTTCGCTCGCTA-3') previously described [10]. As a positive control, we used an extracted DNA from *C. burnetii* strain isolated from ticks from Argentina [11]. Samples were analyzed in duplicate. Positive samples were sent to sequencing and analyzed by 1% agarose gel and purified with Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Inc.), BigDye® Terminator Sequencing Reaction v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and precipitation reaction by Ethanol / EDTA / Sodium Acetate. Automatic sequencing by capillary electrophoresis on the ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) and alignment of the nucleotide sequences produced with the reference sequences deposited in GenBank.

2.3.3. Probe protocol

For quantification purposes, qPCR using specific probes also targeting *IS1111* gene of *C. burnetii* was performed at the Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES, Sophia-Antipolis, France), the World Organization for Animal Health (OIE) reference laboratory for Q fever. When different kind of samples of the same fetus was available, both were tested aiming to evaluate the dispersion of the

bacteria in the fetus. Briefly, the PCR reaction was performed in a total volume of 25 μ l containing 320nM of each forward and reverse primers, 200nM of the specific probe (FAM-TAMRA), 1X of Taqman Universal PCR Master mix (Applied Biosystems), 5.7 μ L nuclease-free PCR grade water, and 5 μ L of DNA template. As control of the extraction, we also used 320 nM of primers targeting glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene of ruminants and 200nM of a probe (VIC-TAMRA). All assays were analyzed in CFX96™ equipment (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Cycling conditions were composed of 50°C for 2 minutes, 95°C for 10 minutes, and 40 cycles of 95 for 15 seconds, 60°C for 1 minute. The fluorescence was recorded at the end of each cycle. In order to quantify the samples, in each assay, we used a standard containing decimal dilution (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , and 10^2) of *Coxiella burnetii* strain Nine Mile.

3. Results & discussion

C. burnetii was detected in 10.7% (3/28) of aborted fetus samples from cattle and confirmed by sequencing (GenBank accession numbers MH766656, MH766657, and MH766658). Quantification results demonstrated a concentration of *C. burnetii* ranging from 569 to 1.57×10^4 bacteria (Table 1). Moreover, the pathogen was found in different tissues of the fetus CbB_F2 indicating a wide spread of the bacteria. To our knowledge, this is the first confirmation of abortion in cattle due to *C. burnetii* in Brazil and the first report in the country of using a quantitative assay to confirm the role of the pathogen in the abortion episode in ruminants.

C. burnetii is associated with late miscarriage and fetal death in ruminants, and with metritis and infertility in cattle [1,12]. The outcome of an intrauterine infection with *C. burnetii* depends on gestation stage, strain virulence, maternal and fetal immune responses, and severity of placental infection and lesions, and spread to the fetus [5]. The pathogenic

consequences related to coxiellosis to the bovine host have been underestimated, and in Brazil, our results suggest that this bacterium can have a role in miscarriage of cows and represents not only an economic issue in livestock production but also an environmental zoonotic risk due to a large number of bacteria shed during birth and the small infective dose of 1 to 10 bacteria [1,3,7]. In addition, the shed of this pathogen can become a hazard to the cities near the livestock production since the transport by the wind of infectious particles can reach 30 km or more [13].

The prevalence of 10.7% reported here is in agreement with previous studies since the prevalence of *C. burnetii* in abortion from cattle has great variations between countries [14], such as Netherlands (4%), Switzerland (12.1%), United Kingdom (7.3%), Italy (11.3%), Portugal (17.2%) [15–19]. The diversity of ubiquity can be related to the circulation of different genotypes, including the possible presence of species-specific ones, with variable degrees of virulence among strains [20] and also associated to distinct rates of endemicity [14,17]. Cases of human Q fever [21,22] and the evidence of abortion in cows expressed here are indicative of virulent strains circulating in Brazil.

Diagnosis of abortion due *C. burnetii* can be performed using a different kind of samples, but the interpretation varies according to the approach used [1,8]. The World Organization for Animal Health (OIE) and others determined that the diagnosis of abortion due *C. burnetii* must be accomplished with quantitative qPCR [1,8]. If the diagnosis relies on the detection in the aborted fetus, a positive result in tissues or stomach contents by molecular methods is sufficient to diagnose Q fever as the origin of abortion [8]. We observed quantitative results of 569, 3.67×10^3 , 9.58×10^3 , and 1.57×10^4 bacteria in the fetus samples, suggesting that not only *C. burnetii* was responsible for the abortion but also that a massive infection has occurred in fetus CbB_F2 and CbB_F5.

Due to massive shed of the pathogen during birth, its small infective dose, and the aerosol transmission to long distances, the implementation of surveillance programs for animal and human health must be performed, with the inclusion of *C. burnetii* in the list of abortive pathogens in livestock in Brazil

4. Conclusions

The detection of *C. burnetii* in the aborted fetus from cows exposes the excretion of the pathogen in the environment and indicates that cattle must be considered a reservoir of infection for humans and animals in Brazil. To our knowledge, this is the first confirmation of abortion in ruminants due to *C. burnetii* in Brazil using a quantitative qPCR assay, as preconized by OIE, and the first report of *C. burnetii* in cases of abortion of cows in Brazil.

5. Acknowledgements

For the scholarship number 88887.137563/2017-00 provided by the General Program for International Cooperation (PGCI) from the Coordination of Improvement of Higher Level Personnel (CAPES).

6. References

- [1] OIE. Q Fever. Man. Diagnostic Tests Vaccines Terr. Anim., Paris: World Organisation for Animal Health; 2018, p. 1–18.
- [2] Anderson A, Bijlmer H, Fournier P-E, Graves S, Hartzell J, Kersh GJ, et al. Diagnosis and management of Q fever--United States, 2013: recommendations from CDC and the Q Fever Working Group. MMWR Recomm Rep 2013;62:1–30.
- [3] Marrie TJ, Minnick MF, Textoris J, Capo C, Mege J-L. Coxiella. In: Tang Y-W, Sussman M, Liu D, Poxton I, Schwartzman J, editors. Mol. Med. Microbiol. Second,

- Elsevier; 2015, p. 1941–72. doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00106-2.
- [4] Bildfell RJ, Thomson GW, Haines DM, McEwen BJ, Smart N. *Coxiella burnetii* Infection is Associated with Placentitis in Cases of Bovine Abortion. J Vet Diagnostic Investig 2000;12:419–25. doi:10.1177/104063870001200505.
- [5] Agerholm JS. *Coxiella burnetii* associated reproductive disorders in domestic animals- a critical review. Acta Vet Scand 2013;55:13. doi:10.1186/1751-0147-55-13.
- [6] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th ed. Washington D.C.: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health; 2009.
- [7] Guatteo R, Joly A, Beaudeau F. Shedding and serological patterns of dairy cows following abortions associated with *Coxiella burnetii* DNA detection. Vet Microbiol 2012;155:430–3. doi:10.1016/j.vetmic.2011.09.026.
- [8] Sidi-Boumedine K, Rousset E, Henning K, Ziller M, Niemczuck K, Roest HIJ, et al. Development of harmonised schemes for monitoring and reporting of rabies in animals in the European Union. EFSA Support Publ 2010;7:1–48. doi:10.2903/sp.efsa.2010.EN-67.
- [9] Vaidya VM, Malik SVS, Bhilegaonkar KN, Rathore RS, Kaur S, Barbuddhe SB. Prevalence of Q fever in domestic animals with reproductive disorders. "Comparative Immunol Microbiol Infect Dis 2010;33:307–21. doi:10.1016/j.cimid.2008.10.006.
- [10] Hoover TA, Vodkin MH, Williams JC. A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. J Bacteriol 1992;174:5540–8. doi:10.1128/jb.174.17.5540-5548.1992.

- [11] Pacheco RC, Echaide IE, Alves RN, Beletti ME, Nava S, Labruna MB. *Coxiella burnetii* in ticks, Argentina. Emerg Infect Dis 2013;19:344–6.
doi:10.3201/eid1902.120362.
- [12] Maurin M, Raoult D. Q Fever. Clin Microbiol Rev 1999;12:518–53.
doi:10.1128/CMR.12.4.518.
- [13] Tissot-dupont H, Amadei M, Nezri M, Raoult D. Wind in November , Q fever in December. Emerg Infect Dis 2004;10:1264–9. doi:10.3201/eid1007.030724.
- [14] Guatteo R, Seegers H, Taurel AF, Joly A, Beaudeau F. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: A critical review. Vet Microbiol 2011;149:1–16.
doi:10.1016/j.vetmic.2010.10.007.
- [15] Muskens J, Wouda W, von Bannisseht-Wijsmuller T, van Maanen C. Prevalence of *Coxiella burnetii* infections in aborted fetuses and stillborn calves. Vet Rec 2012;170:260–260. doi:10.1136/vr.100378.
- [16] Parisi A, Fraccalvieri R, Cafiero M, Miccolupo A, Padalino I, Montagna C, et al. Diagnosis of *Coxiella burnetii*-related abortion in Italian domestic ruminants using single-tube nested PCR. Vet Microbiol 2006;118:101–6.
doi:10.1016/j.vetmic.2006.06.023.
- [17] Vidal S, Kegler K, Greub G, Aeby S, Borel N, Dagleish MP, et al. Neglected zoonotic agents in cattle abortion: tackling the difficult to grow bacteria. BMC Vet Res 2017;13:373. doi:10.1186/s12917-017-1294-y.
- [18] Pritchard GC, Smith RP, Errington J, Hannon S, Jones RM, Mearns R. Prevalence of *Coxiella burnetii* in livestock abortion material using PCR. Vet Rec 2011;169:391.
doi:10.1136/vr.d4693.

- [19] Clemente L, Barahona MJ, Andrade MF, Botelho A. Diagnosis by PCR of *Coxiella burnetii* in aborted fetuses of domestic ruminants in Portugal. Vet Rec 2009;164:373–4. doi:10.1136/vr.164.12.373.
- [20] Joulié A, Sidi-Boumedine K, Bailly X, Gasqui P, Barry S, Jaffrelo L, et al. Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* in French livestock reveals the existence of three main genotype clusters and suggests species-specific associations as well as regional stability. Infect Genet Evol 2017;48:142–9. doi:10.1016/j.meegid.2016.12.015.
- [21] Lemos ERS, Rozental T, Siqueira BN, Júnior AAP, Joaquim TE, da Silva RG, et al. Q Fever in Military Firefighters during Cadet Training in Brazil. Am J Trop Med Hyg 2018;99:303–5. doi:10.4269/ajtmh.17-0979.
- [22] Siciliano RF, Strabelli TM, Zeigler R, Rodrigues C, Castelli JB, Grinberg M, et al. Infective endocarditis due to Bartonella spp. and *Coxiella burnetii*: experience at a cardiology hospital in Sao Paulo, Brazil. Ann N Y Acad Sci 2006;1078:215–22. doi:10.1196/annals.1374.123.

Tables

Table 3. Quantification through Real-time PCR of *Coxiella burnetii* in the aborted fetus from cattle.

Fetus	Type of sample	Cycle threshold	Concentration of <i>C. burnetii</i>
CbB_F1	Pool of organs	36.11	5.69×10^2
CbB_F1	Brain	NA*	NA
CbB_F2	Pool of organs	33.24	3.67×10^3
CbB_F2	Brain	31.76	9.58×10^3
CbB_F5	Abomasal content	31.00	1.57×10^4
CbB_F5	Abomasal content	NA	NA

Legend: * not applicable (sample was negative in the quantification assay)

CAPÍTULO 5 – NEW GENOTYPES OF *Coxiella burnetii* CIRCULATING IN SOUTH AMERICA.

Emerging Infectious Diseases - Dispatch (<https://wwwnc.cdc.gov/eid/page/manuscript-preparation>)

Authors: Mateus de Souza Ribeiro Mioni, Karim Sidi-Boumedine, Felipe Morales Dalanezi, Sâmea Fernandes Joaquim, Renan Denadai, Bruna Letícia Davidé Ribeiro, Wanderson Sirley Reis Teixeira, Vanessa Cristina Pelícia, Marcelo Bahia Labruna, Jane Megid*.

Affiliations:

Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho¹, Botucatu, São Paulo, Brazil (Mateus S. R. Mioni, Felipe M. Dalanezi, Sâmea F. Joaquim, Renan Denadai, Bruna L. D. Ribeiro, Marina G. Peres, Wanderson S. R. Teixeira, Vanessa C. Pelícia, Jane Megid).

Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. (Marcelo B. Labruna)

Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail², Sophia-Antipolis, France (Karim Sidi-Boumedine)

^{1,2} Institutions in which the work was done

***Corresponding author:** Jane Megid, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho - UNESP, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu-São Paulo, Brasil. Cep: 18618-970; e-mail: jane.megid@unesp.br

Article summary line: Genotypes of *Coxiella burnetii* in South America.

Abstract

Molecular epidemiology has important implications for the understanding, control, and prevention of infectious diseases. We report the identification of new genotypes based on Multilocus Sequencing Typing (MST) and Multi locus Variable Tandem Number repeats Analysis (MLVA) of *Coxiella burnetii* circulating in Brazil and Argentina.

Text

Coxiella burnetii is the causative agent of Q fever in humans and coxiellosis in animals (1,2) a disease that has a worldwide distribution, with exception of New Zealand (1,3). In humans, Q fever is mainly asymptomatic, but an acute, and a chronic and more severe form (2) are also possible outcomes of the disease. The main reservoirs of the disease for humans are domestic ruminants where the infection is associated with late abortion and reproductive disorders. In cows, it is also suggested a link with metritis, placentitis, and infertility (1). Although ticks can transmit *C. burnetii* in experimental systems, in the field the transmission must be infrequently (4).

The importance of Q fever in terms of public health increased after the outbreak in Netherlands, where in 4 years more than 4,000 people became ill and 50,000 animals had to be slaughtered to control the epidemics. The use of molecular typing was useful to determine the source of the outbreak, leading to more precise preventive measures (5). As *C. burnetii* is also classified as a possible bioterrorism agent (6), the genotyping of *C. burnetii* isolates can enhance the ability to identify a source of infection helping to establish preventive and control measures, reducing the number of cases in an outbreak (7) and discarding the malicious use of the bacteria.

The aim of this study was to genotype strains of *C. burnetii* detected in the aborted fetus from cattle, and vaginal swabs from goats and ewes, in Brazil, and also an Argentinian isolate from tick reported by Pacheco et al. (8). This study is the first report of Multilocus Variable Number Tandem Repeats Analysis (MLVA) and Multispacer Sequence Type (MST) genotypes of *C. burnetii* in Brazil and Argentina, and was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA-FMVZ-UNESP/Botucatu, state of Sao Paulo), Brazil, protocol number 0203/2016.

MLVA was performed using 17 markers, and coding was based on the methodology previously described (7) and the new MLVA recommendations issued by Université de Paris-Sud (<http://mlva.u-psud.fr/MLVAnet/spip.php?rubrique50>). All *C. burnetii* Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) loci were amplified via PCR according to the procedure described elsewhere (7,9). PCR products were run on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Les Ulis, France) using a DNA 7500 LabChip®kit in accordance with the manufacturer's instructions. In both, the *C. burnetii* Nine Mile strain was used as the reference and was included in all the experiments to normalize each assay and to compare the MLVA profiles. For sake of comparison, we used the software BioNumerics version 7.5 created by Applied Maths NV. (Available from <http://www.applied-maths.com>) to create a minimum spanning tree with the following strains from goats, ewes, cattle, ticks, and humans were used for sake of comparison: Namibia, Priscilla Q177, Z3055, #801, CbuG_Q212, Cb175, RSA331, #755, CS-Florian, CbuK_Q154, Scurry Q217, CS-Dayer, Nine Mile, and Dugway 5J108-111.

MST genotyping was performed using primers described by Glazunova et al. (10) for 10 loci markers amplified via PCR. The mix solution and cycling conditions were performed according to manufactures protocol of the enzyme PhusionTM (ThermoFisher Scientific) with the annealing temperature of 57°C/30sec, as previous described (10). Amplicons were sent to

Sanger sequencing and results were analyzed using Bioedit™ (Carlsbad, CA, USA).

Consensus sequences of each MST spacers were blasted and compared in the website of the institution Méditerranée Infection (http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella_burnetii/).

All strains from Brazil and Argentina are novel MLVA and MST genotypes of *C. burnetii* according to comparison in the MLVA database (<http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/>) and in the MST database. Table 1 summarizes the analyses of repeats for all South American strains and Nine Mile. The MST comparison at http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella_burnetii/ is depicted in Table 2. The comparison performed with 17 loci and MLVA6 in the database resulted in novel MLVA genotypes, with closer relation with MLVA6 types 68, 71, 66, 65 for strain At12, and types 5 and 19 for cattle strains.

Some loci presented flaws of amplification, probably due to the low concentration of the samples, around 10^3 bacteria/mL. When a minimum spanning tree was design based on all 17 loci (Figure 1), it was possible to observe all cattle strains cluster close to each other and with a link to goat strain CbG_SVB22. All ovine strains also clustered near to each other but far to the cattle and goat strains. The Argentinian strain isolated from a tick by Pacheco (8) has a different MLVA profile from the Brazilians strains and had a weak correlation with the ruminant strains evaluated here.

Because the lack of data for some loci can lead to impairment of kinship between strains, a minimum spanning tree was drawn with the 6 genotyped loci (ms21, ms22, ms23, ms28, ms33, and ms34) common to all strains in the analysis (Figure 2), decreasing the discriminatory power and facilitating the observation of parenthood.

MST was performed for the Argentinian strain At12 isolated from a tick (8), and for the Brazilians strains from cattle (CbB_F2), goat (CbG_SVB22), and ovine (CbO_sn2). Table 2

summarizes loci assignment for MST types in South America. The combination of alleles of all strains have not been observed among 61 MST genotypes currently recognized in the *Coxiella* MST database, representing new genotypes of *C. burnetii* circulating in Brazil and Argentina. Furthermore, loci Cox20, Cox37, Cox51, Cox56, and Cox57 of strain At12 revealed several polymorphisms, and those alleles were assigned as new. CbG_SVB22 (GenBank accession number MK168659–MK168664), and CbB_F2 and the ovine strain have the same MST loci combination and seem to be a similar clone.

Recently, a genotyping method based on the sequencing of 16S rRNA gene revealed that *C. burnetii* can be divided into six geno groups according to SNPs in position 64, 164, 622, 830, and 1022, and also an indel in position 233 (11). An analysis of the 16S rRNA gene from the Argentinian strain At12 sequenced previously by Pacheco et al. (8) (GenBank accession number JQ740886.1) and from strain Cb_175, from French Guiana (GenBank accession number HG825990.3), the only MST type described in South America revealed that both strains belong to the geno group I described by McLaughlin (11) since it possesses SNPs GCCAC in the positions 64, 164, 622, 830, 1022 of the gene. This 16s rRNA geno group harbor MST types 16, 17, 20, 26 and Dugway (11). Because of the 16S rRNA is more conserved gene than intergenic spacers, which present higher polymorphisms and a greater possibility of mutations (12), this technique can be used as a stable method to genotype and can contribute to assigning relation between strains.

There are 17 based on MST genotyping, with only one performed in South America (15,16). Some MST types can be found across the world, such as MST20, that was described in ruminants and humans across North America, Europe and Africa (13). There is a lack of virulence and genotyping studies in South America, with only genotype MST 17 described from this region (13). The report of cases of Q fever and animal coxiellosis in Brazil and Argentina indicate the presence of virulent strains circulating in those countries. The majority

of cases of Q fever is flu-like symptoms or fever, and these features can lead to sub notification in Brazil due to the nonspecific symptoms and the lack of differential diagnosis with Dengue, one of the most important febrile illness in Brazil (15).

This is the first genotype study of *Coxiella* strains from Brazil and Argentina using MST and MLVA, molecular tools commonly used for this pathogen. Those techniques allow the comparison between strains and the traceability of source of outbreaks of Q fever, helping to develop control and preventive measures for the disease and a better understanding of the epidemiology of the disease. Since cases of Q fever have been reported in Brazil and other countries of South America, more genotype studies, and also research aiming isolation and virulence assessment of strains, are necessary to better understand the situation of Q fever in this region.

Acknowledgements

For the scholarship number 88887.137563/2017-00 provided by the General Program for International Cooperation (PGCI) from the Coordination of Improvement of Higher Level Personnel (CAPES).

References

1. OIE. Q Fever. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [Internet]. Paris: World Organisation for Animal Health; 2018. p. 1–18. Available from: <http://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
2. Anderson A, Bijlmer H, Fournier P-E, Graves S, Hartzell J, Kersh GJ, et al. Diagnosis and management of Q fever--United States, 2013: recommendations from CDC and the Q Fever Working Group. MMWR Recomm Rep [Internet]. 2013 Mar 29;62(RR-03):1–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23535757>
3. Marrie TJ, Minnick MF, Textoris J, Capo C, Mege J-L. *Coxiella*. In: Tang Y-W,

- Sussman M, Liu D, Poxton I, Schwartzman J, editors. Molecular Medical Microbiology [Internet]. Second. Elsevier; 2015. p. 1941–72. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123971692001062>
4. Duron O, Sidi-Boumedine K, Rousset E, Moutailler S, Jourdain E. The Importance of Ticks in Q Fever Transmission: What Has (and Has Not) Been Demonstrated? Trends Parasitol [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;31(11):536–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2015.06.014>
 5. Schneeberger PM, Wintenberger C, van der Hoek W, Stahl JP. Q fever in the Netherlands - 2007-2010: what we learned from the largest outbreak ever. Med Mal Infect [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2014 Aug;44(8):339–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2014.02.006>
 6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories [Internet]. 5th ed. Chosewood LC, Wilson DE, editors. Washington D.C.: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health; 2009. 415 p. Available from: <https://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/>
 7. Arricau-Bouvery N, Hauck Y, Bejaoui A, Frangoulidis D, Bodier CC, Souriau A, et al. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. BMC Microbiol [Internet]. 2006 Apr 26;6(1):38. Available from: <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-6-38>
 8. Pacheco RC, Echaide IE, Alves RN, Beletti ME, Nava S, Labruna MB. *Coxiella burnetii* in ticks, Argentina. Emerg Infect Dis [Internet]. 2013 Feb;19(2):344–6. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/2/12-0362_article.htm

9. Prigent M, Rousset E, Yang E, Thiéry R, Sidi-Boumedine K. Validation study for using lab-on-chip technology for *Coxiella burnetii* multi-locus-VNTR-analysis (MLVA) typing: Application for studying genotypic diversity of strains from domestic ruminants in France. *Microbes Infect.* 2015;17(11–12):782–8.
10. Glazunova O, Roux V, Freylikman O, Sekeyova Z, Fournous G, Tyczka J, et al. *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2005 Aug;11(8):1211–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16102309>
11. McLaughlin HP, Cherney B, Hakovirta JR, Priestley RA, Conley A, Carter A, et al. Phylogenetic inference of *Coxiella burnetii* by 16S rRNA gene sequencing. Dumler JS, editor. *PLoS One* [Internet]. 2017 Dec 29;12(12):e0189910. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5747434/pdf/pone.0189910.pdf>
12. Karlsson E, Macellaro A, Byström M, Forsman M, Frangoulidis D, Janse I, et al. Eight new genomes and synthetic controls increase the accessibility of rapid melt-MAMA SNP typing of *Coxiella burnetii*. *PLoS One.* 2014;9(1).
13. Eldin C, Mélenotte C, Mediannikov O, Ghigo E, Million M, Edouard S, et al. From Q Fever to *Coxiella burnetii* Infection: a Paradigm Change. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2017 Jan 16;30(1):115–90. Available from: <http://cmr.asm.org/content/30/1/115.full>
14. Mahamat A, Edouard S, Demar M, Abboud P, Patrice JY, Scola BL, et al. Unique clone of *Coxiella burnetii* causing severe Q fever, French Guiana. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(7):1102–4.
15. Mares-Guia MAMM, Rozental T, Guterres A, Ferreira MDS, Botticini RDG, Terra AKC, et al. Molecular Identification of Q Fever in Patients with a Suspected Diagnosis

of Dengue in Brazil in 2013-2014. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2016 May

4;94(5):1090–4. Available from: <http://www.ajtmh.org/cgi/doi/10.4269/ajtmh.15-0575>

Tables

Table 4. Results of *Coxiella burnetii* analysis based on the Multilocus Variable Tandem repeat Analysis (MLVA).

Strain	Host	Country	ms01	ms03	ms07	ms12	ms20	ms21	ms22	ms23	ms24	ms26	ms27	ms28	ms30	ms31	ms33	ms34	ms36
2P	Tick	Argentina	4	6	6	8	18	7	6	3	7	2	2	5	12	3	9	2	11
CbB_F1	Cattle	Brazil	NA	NA	NA	6	15	6	6	6	18	NA	2	7	12	3	9	9	4
CbB_F2	Cattle	Brazil	3	6	8	6	15	6	6	6	18	NA	3	7	12	3	9	9	4
CbB_F5	Cattle	Brazil	3	6	NA	NA	15	6	6	6	12	NA	2	7	12	NA	9	10	4
CbO_11	Ovine	Brazil	NA	7	11	7	13	9	6	9	27	8	NA	6	12	NA	9	5	NA
SVB - 22	Goat	Brazil	NA	6	8	7	15	6	6	6	NA	8	2	7	19	3	9	11	4
CbO_SN2	Ovine	Brazil	4	7	NA	NA	NA	6	6	9	27	NA	4	6	12	5	9	5	NA
CbO_652	Ovine	Brazil	NA	7	NA	10	16	9	6	9	27	NA	4	6	NA	5	6	5	NA
Nine Mile	Tick	USA	4	7	8	8	15	6	6	9	27	4	4	6	12	5	9	5	4

Table 5. Results of *Coxiella burnetii* genotyping based on Multispacers Typing Sequencing (MST).

			MST intergenic spacers									
Strain	Host	Country	Cox 2	Cox 5	Cox 18	Cox 20	Cox 22	Cox 37	Cox 51	Cox 56	Cox 57	Cox 61
Cb_At12	Tick	Argentina	3	6	8	NEW	6	NEW	NEW	NEW	NEW	6
CbO_SN2	Sheep	Brazil	3	–	5	–	–	10	–	–	–	5
CbB_F2	Cattle	Brazil	3	2	5	–	–	10	–	–	–	5
SVB-22	Goat	Brazil	3	2	5	–	–	10	–	10	–	5

Figures

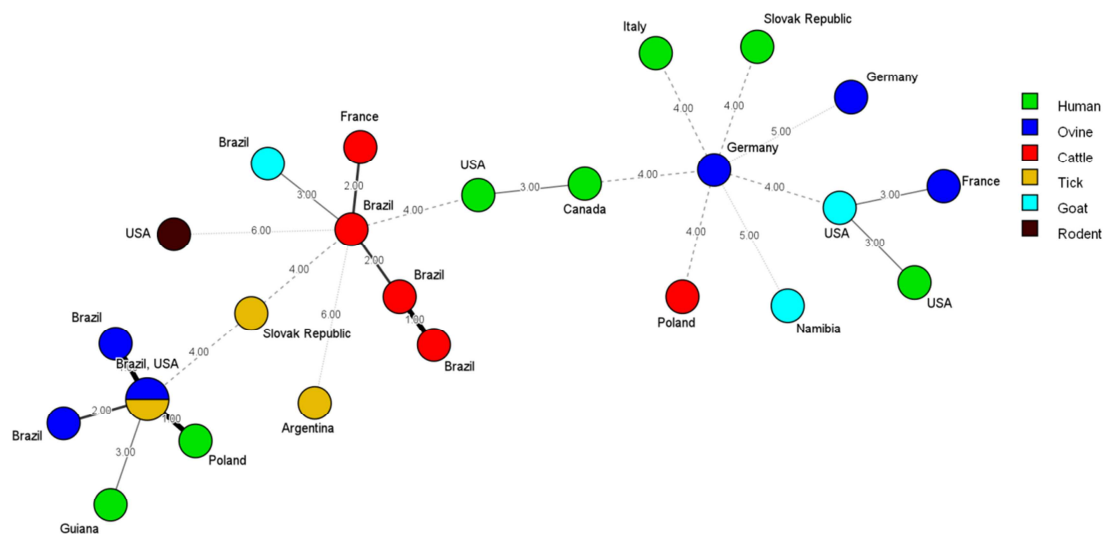


Figure 5. Minimum Spanning Tree of *Coxiella burnetii* using all MLVA loci.

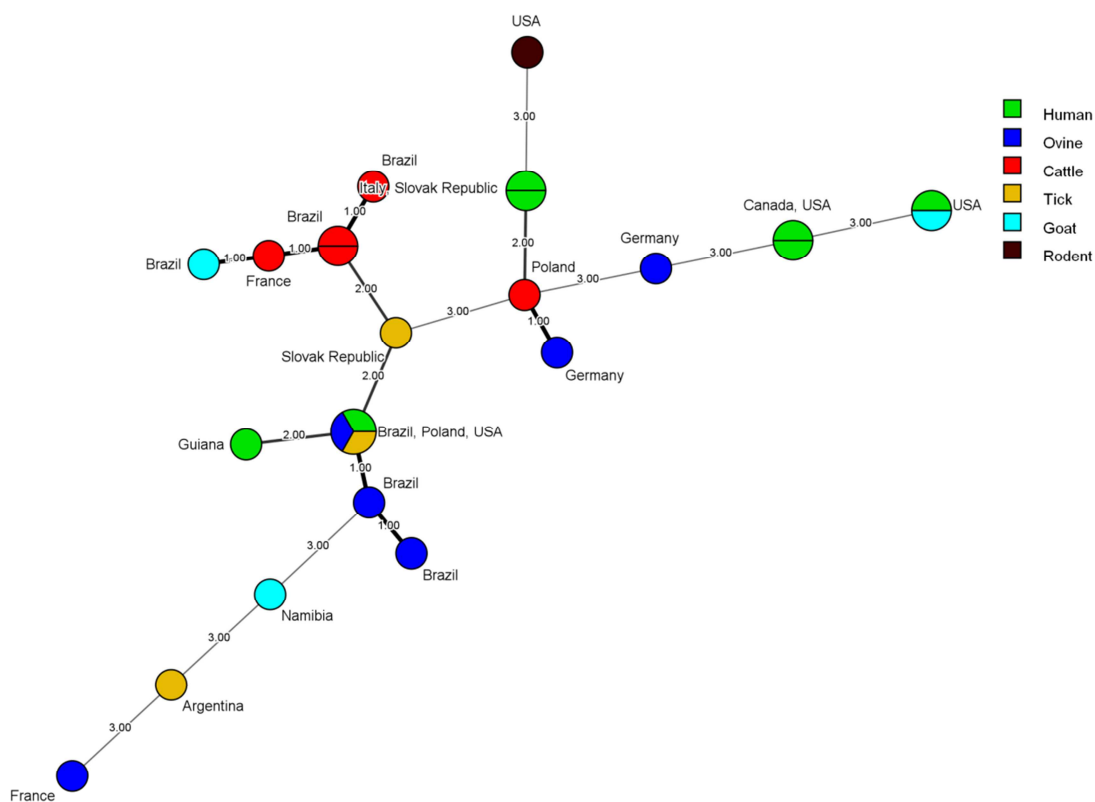


Figure 6. Minimum Spanning tree of *Coxiella burnetii* using only genotyped loci.

CAPÍTULO 6 – DISCUSSÃO GERAL

Durante o estudo, *C. burnetii* foi detectada por métodos moleculares e sorológicos, em bovinos enviados para abate e em abortamentos de bovinos. A circulação das bactérias pôde ser verificada por IFA em 360 amostras (23,8% [IC95%=21,7% – 25,9%]), indicando exposição passada ou recente, e a presença do patógeno na corrente sanguínea dos animais no momento do abate foi confirmada por qPCR em 92 animais soropositivos (24,3% [IC95%=20,1% – 28,8%]). A prevalência real foi calculada em 20,0% [IC95%=17,8% – 22,3%] e 28,7% [IC95%=23,8% – 34,1%] para IFA e qPCR, respectivamente. A construção de mapas de calor baseados na detecção por RIFI e por qPCR permitiu a visualização da distribuição de *C. burnetii* em todo o estado de São Paulo. Utilizando metodologias de genotipagem baseadas em MLVA e MST, constatou-se a presença de genótipos singulares ainda não descritos na literatura.

Em vários países, o uso do diagnóstico sorológico em matadouros foi o método primário de vigilância de doenças zoonóticas. A eficiência dessa abordagem depende da existência de um sistema de rastreabilidade, sendo útil para detecção e monitoramento de patógenos em regiões com prevalência relativamente alta (NIELSEN e DUNCAN, 1990). A amostragem em matadouros tem algumas vantagens quando a prevalência de uma doença é desconhecida, como possibilidade de amostragem de um grande número de animais de diferentes cidades, regiões e produtores em um curto espaço de tempo. Entretanto, a população de abate é composta majoritariamente por machos saudáveis e, por isso, nossos resultados estimam mais a prevalência de *C. burnetii* em bovinos do que da coxielose, uma vez que a maioria dos animais é assintomática para a doença e o principal sinal clínico está relacionado a distúrbios reprodutivos em fêmeas (BILDFELL et al., 2000; AGERHOLM, 2013; OIE, 2018), característica que não pode ser avaliada dentro de matadouros devido ao pequeno período de observação e também porque a maioria dos animais abatidos é do sexo masculino. Portanto, com base nessas observações, amostras colhidas em matadouros podem ser corrigidas, se necessário, para idade e sexo para estimar a prevalência na população, (SCHÄRRER, 2014).

A prevalência real de 20,0% encontrada na RIFI em abatedouros, embora inferior à prevalência mediana de 37,7% para bovinos de rebanho (GUATTEO et al., 2011), ainda é considerada alta. Nosso resultado é semelhante ao estudo anterior realizado em matadouros no Brasil (RIEMANN et al., 1975), onde a prevalência avaliada usando TFC foi de 29%. Estudo conduzido na Austrália em bovinos de corte utilizando um teste comercial de ELISA para febre Q, desenvolvido na Europa, e TFC, relatou números baixos de amostras positivas no ELISA (2/329) e nenhuma reação positiva no TFC (BANAZIS et al., 2010). Em contraste, estudo realizado em abatedouros de Queensland evidenciou 16,8% de positividade em ELISA quando testados com um antígeno produzido a partir de um isolado australiano de *C. burnetii* (COOPER et al., 2011).

O resultado do diagnóstico sorológico pode ter influência do antígeno utilizado, uma vez que várias características podem interferir na sensibilidade e especificidade do sorodiagnóstico, como o antígeno e a cepa utilizada, devido possível a presença de diferenças antigênicas entre isolados de diferentes regiões (COOPER et al., 2011). Estudos comparando antígenos produzidos a partir da linhagem *Nine Mile*, uma linhagem ovina e linhagens de ruminantes, relataram melhor sensibilidade e especificidade nos testes diagnósticos que utilizavam cepas de ovinos e ruminantes para a produção do antígeno (EFSA, 2010; HORIGAN et al., 2011). Outro fator que possui importante influência nos testes diagnósticos é a concentração das diferentes fases do LPS de *C. burnetii* (OIE, 2018). O LPS de fase II é o antígeno imunodominante e anticorpos contra a fase II estão sempre presentes durante a infecção, sendo, portanto, mais indicado para estudos epidemiológicos em animais (ROUSSET et al., 2012; O'NEILL et al., 2013). A resposta imunológica ao LPS de fase I ocorre posteriormente com consequente aumento do título de anticorpos anti-fase I, por esse motivo, maiores títulos contra fase I estão relacionados à infecção crônica em humanos (ROUSSET et al., 2012; ANDERSON et al., 2013). Em nosso estudo, usamos um antígeno "*in house*" produzido a partir de uma cepa de *C. burnetii* isolada de carrapatos provenientes da Argentina. Como essa cepa ainda não passou por várias passagens na cultura de células e é composta principalmente por células de fase I, a prevalência aqui reatada pode estar subestimada devido a menor detecção de anticorpos contra a fase II. Além disso, o uso de uma cepa argentina proveniente de carrapatos também pode ter impacto no

resultado decorrente de diferenças antigênicas pela presença de cepas espécie-específicas e regionais (COOPER et al., 2011; JOULIÉ et al., 2017).

A detecção por qPCR de *C. burnetii* em amostras soropositivas demonstra a presença do patógeno na corrente sanguínea no momento do abate. O uso de qPCR em soros humanos para detecção de *C. burnetii* é essencial para o diagnóstico de febre Q aguda (SCHNEEBERGER et al., 2010; WIELDERS et al., 2013). Em animais, apenas alguns estudos relataram o uso de diagnóstico molecular em amostras de soro. To et al. (1998), utilizando nested PCR, relataram 3,9% de *C. burnetii* no soro de vacas leiteiras com distúrbios reprodutivos. Em outro estudo, durante uma alta incidência de abortamentos em cabras, 20 amostras de soro foram testadas por qPCR e o DNA do patógeno foi detectado em 12 amostras, sendo 10 soropositivos e 2 soronegativos no TFC (EMERY et al., 2014). O uso de diagnóstico molecular em soros também foi usado para identificar a fonte de infecção humana no Japão, onde 2 pacientes humanos, 2 cães e 3 gatos foram positivos usando nested PCR. A análise de sequenciamento dos humanos e dos cães mostrou um elevado grau de similaridade para o gene *com1*, e em todos os quatro isolados o plasmídeo QpH1 estava presente. Além disso, os autores foram capazes de isolar *C. burnetii* das amostras de soro, demonstrando a presença de bactérias viáveis neste tipo de amostra (KOMIYA et al., 2003). O isolamento de *C. burnetii* em soro de humanos com febre Q aguda também foi recentemente realizado na Austrália em cultura de células (VINCENT et al., 2015), corroborando com a presença de bactérias viáveis no soro e no sangue. Esses fatos enfatizam o risco de adquirir febre Q devido ao contato com sangue de animais infectados, uma possibilidade que aumenta dentro de matadouros devido ao contato íntimo com os animais.

Como a principal via de transmissão da febre Q é por inalação de partículas infecciosas, nossos resultados evidenciam o risco de infecção para os trabalhadores dos matadouros, uma vez que os aerossóis podem ser produzidos durante os procedimentos de abate como sangria, serragem de meias-carcaças, entre outros (KAUFMANN et al., 1980; ALLEYNE et al., 1986). A quantificação de *C. burnetii* na corrente sanguínea por qPCR quantitativo resultou na concentração de 10 a 814 bactérias / mL (média de 133 células / mL). Como *C. burnetii* é um patógeno intracelular, no sangue total do gado abatido é provável que haja um maior número de bactérias por mL do que o registrado em amostras de soro. Como a dose

infectante de *C. burnetii* para humanos é baixa (1 a 10 bactérias)(GAMA et al., 2012) e o volume de sangue durante o abate é grande, o risco de formação de aerossóis passível de veicular o patógeno é demasiado.

Ademais, *C. burnetii* foi detectada em 10,7% (3/28) das amostras de fetos abortados de bovinos e confirmada por sequenciamento (números de acesso do GenBank MH766656, MH766657 e MH766658). A quantificação por qPCR demonstrou uma concentração de *C. burnetii* variando de 569 a 1.57×10^4 bactérias por grama de tecido. Os resultados aqui expostos sugerem que esta bactéria pode ter um papel importante em abortamentos de vacas e representa não apenas uma questão econômica na produção animal, mas também um risco zoonótico devido ao grande número de bactérias eliminadas durante o parto, da ordem de 10^9 por grama de placenta, e a pequena dose infecciosa para humanos (GUATTEO et al., 2012; MARRIE et al., 2015).

A prevalência de *C. burnetii* em abortamentos de bovinos apresenta grandes variações entre os países (GUATTEO et al., 2011). A ampla variação da prevalência pode estar relacionada à circulação de diferentes genótipos, incluindo a possível presença de estirpes espécie-específicas, com graus variáveis de virulência entre as linhagens (ELDIN et al., 2017; JOULIÉ et al., 2017), e também associados a distintas taxas de endemicidade (GUATTEO et al., 2011). Não há informações sobre genótipos circulantes no país nem sobre virulência, mas casos de febre Q humana (MARES-GUIA, 2015; LEMOS et al., 2018) e a evidência de abortamentos em vacas, aqui expressas, e em cabras (DE OLIVEIRA et al., 2018) são indicativos de cepas virulentas no território.

A detecção de *C. burnetii* em fetos abortados expõe a excreção do patógeno no ambiente e indica que bovinos devem ser considerados reservatório para a infecção humana e outros animais no Brasil. Além disso, a presença de *C. burnetii* no soro de bovinos abatidos nos revela uma potencial disseminação por rotas como leite, fezes e muco vaginal, aumentando a suspeita de que o microrganismo oferece real ameaça à população. A detecção concomitante em bovinos soropositivos foi estudada por GUATTEO et al.(2006) que encontrou o patógeno em 5% das amostras de soro e em 25% das amostras de leite, indicando que a disseminação da bactéria pelas diversas vias pode ocorrer devido à circulação na corrente sanguínea,

mas que a presença de uma infecção local também pode levar a excreção de *C. burnetii* sem a detecção no soro. Além disso, os bezerros que ingeriram leite com *C. burnetii* eliminam a bactéria na urina e fezes, facilitando assim a propagação da infecção no ambiente, com isso, os rebanhos de bovinos assintomáticos devem, portanto, ser considerados potenciais reservatórios bacterianos capazes de transmitir a doença (RODOLAKIS, 2009).

O relato de animais positivos e com infecção ativa por *C. burnetii* também representa uma ameaça para as pessoas que vivem nas áreas vizinhas da produção pecuária uma vez que animais, assintomáticos ou não, podem disseminar bactérias no ambiente levando a uma possível disseminação da *C. burnetii* para áreas urbanas através do vento por longas distâncias (HAWKER et al., 1998; TISSOT-DUPONT et al., 2004; NUSINOVICI et al., 2015). Estudos epidemiológicos são importantes para determinar a situação de saúde de rebanhos a fim de estipular as medidas preventivas a serem adotadas, sendo a detecção de animais disseminadores da bactéria crucial para o controle (RODOLAKIS, 2009).

A genotipagem das amostras positivas de *C. burnetii*, de acordo com a comparação no banco de dados de MLVA (<http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/>) utilizando os 17 loci e MLVA6, revelou que todas as cepas do Brasil e da Argentina são novos genótipos de *C. burnetii*, com uma relação mais próxima com MLVA6 tipos 68, 71, 66, 65 para a estirpe At12 e genótipos 5 e 19 para estirpes de ruminantes. Através da análise da árvore geradora mínima com todos os 17 loci demonstrou que as amostras brasileiras se encontram distantes da estirpe de *C. burnetii* isolada de carrapato por Pacheco et al. (2013), e com maior proximidade da cepa CbB1, detectada em bovinos, na França. Na MLVA, técnica que apresenta maior poder de discriminação do que a MST (SVRAKA et al., 2006; ROEST et al., 2011a), a linhagem caprina CbG_SVB22 apresentou maior semelhança com estirpes bovinas do que com as amostras de ovinos. Como a ausência de alguns loci pode levar ao comprometimento do parentesco entre as cepas, uma árvore geradora mínima foi desenhada apenas com os 6 loci genotipados (ms21, ms22, ms23, ms28, ms33 e ms34) comuns a todas as cepas na análise, diminuindo o poder discriminatório e facilitando a observação da parentalidade. Ainda assim, as cepas bovinas e caprinas demonstraram maior similaridade, com relação mais próxima do que a cepa ovina.

A combinação de alelos de todas as cepas Sul Americanas não foi observada entre os 61 genótipos MST atualmente reconhecidos na base de dados de MST para *Coxiella* (http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella_burnetii/), representando, também para esta técnica de tipagem, novos genótipos de *C. burnetii*. Além disso, loci Cox20, Cox37, Cox51, Cox56 e Cox57 da cepa At12 revelaram vários polimorfismos, e esses alelos foram designados como novos. CbG_SVB22 (número de acesso no GenBank MK168659-MK168664), CbB_F2 e a estirpe ovina possuem a mesma combinação de alelos e, apesar da falha de amplificação de alguns loci, parecem pertencer a um único clone.

Alguns tipos de MST podem ser encontrados em todo o mundo, como o MST20, descrito em ruminantes e humanos na América do Norte, Europa e África (ELDIN et al., 2017). Na América do Sul, somente há estudos de virulência e genotipagem para o genótipo MST 17, que foi detectada na Guiana Francesa (ELDIN et al., 2017). O relato de casos de febre Q e coxielose animal no Brasil e na Argentina indica a presença de cepas virulentas circulantes nesses países. A maioria dos casos de febre Q é de sintomas gripais ou febre, e essas características podem levar à subnotificação no Brasil devido aos sintomas inespecíficos e à falta de diagnóstico diferencial com Dengue, uma das doenças febris mais importantes no Brasil (MARES-GUIA et al., 2016).

A análise do gene 16S rRNA da cepa argentina At12, seqüenciado anteriormente por Pacheco et al. (2013) (número de acesso do GenBank JQ740886.1), e da cepa Cb_175, da Guiana Francesa (número de acesso do GenBank HG825990.3), o único genótipo MST descrito na América do Sul, revelou que ambas as cepas pertencem ao geno grupo I descrito por McLaughlin et al. (2017), pois apresentam SNPs GCCAC nas posições 64, 164, 622, 830, 1022 do referido gene. Este geno grupo abriga os genótipos de MST 16, 17, 20, 26 e Dugway (MCLAUGHLIN et al., 2017). Pelo fato do gene 16S rRNA ser mais conservado que os espaçadores intergênicos utilizados nas técnicas de MLVA e MST (KARLSSON et al., 2014), essa técnica pode ser utilizada como método estável e de menor poder de discriminatório para estabelecer relação entre as linhagens de *C. burnetii*.

CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES GERAIS

A evidência de abortamentos causados pela coxielose, aliada a alta prevalência encontrada em abatedouros, indica que bovinos são importantes reservatórios do patógeno tanto para humanos como para animais. A observação de infecção ativa nos animais indica a presença de risco para a saúde pública e animal. Ademais, durante a genotipagem das estirpes de *C. burnetii* detectadas durante o estudo, observou-se a presença de genótipos de MLVA e MST ainda não descritos no mundo, o que leva a necessidade de mais estudos de genotipagem e, principalmente, virulência das estirpes circulantes, para a caracterização da situação da enfermidade em território nacional, permitindo, assim, a adoção de medidas preventivas e de controle, diminuindo o risco de infecção da população humana e animal.

É necessário enfatizar o risco ocupacional existente para veterinários, fazendeiros, tratadores, magarefes, e demais profissionais associados à criação de animais, como também a população residente próxima às zonas de criação, sendo importante a inclusão desta doença em programas de vigilância em saúde animal e pública, bem como na lista de doenças abortivas no Brasil.

BIBLIOGRAFIA

ABIEC. **Perfil da Pecuária no Brasil - Relatório Anual 2016**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.newsprime.com.br/img/upload2/2016_FolderPerfil_PT.pdf>.

AGERHOLM, J. S. *Coxiella burnetii* associated reproductive disorders in domestic animals-a critical review. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 55, n. 1, p. 13, 18 fev. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23419216>>.

ALLEYNE, B. C.; ORFORD, R. R.; LACEY, B. A.; WHITE, F. M. Rate of slaughter may increase risk of human brucellosis in a meat-packing plant. **J.Occup.Med.**, v. 28, n. 6, p. 445–450, 1986. Disponível em: <<papers3://publication/uuid/4D13B6E4-B9F0-4C02-9533-62D891710985>>.

ANDERSON, A.; BIJLMER, H.; FOURNIER, P.-E.; GRAVES, S.; HARTZELL, J.; KERSH, G. J.; LIMONARD, G.; MARRIE, T. J.; MASSUNG, R. F.; MCQUISTON, J. H.; NICHOLSON, W. L.; PADDOCK, C. D.; SEXTON, D. J. Diagnosis and management of Q fever--United States, 2013: recommendations from CDC and the Q Fever Working Group. **MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports / Centers for Disease Control**, v. 62, n. RR-03, p. 1–30, 29 mar. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23535757>>.

ANGELAKIS, E.; MEDIANNIKOV, O.; SOCOLOVSCHI, C.; MOUFFOK, N.; BASSENE, H.; TALL, A.; NIANGALY, H.; DOUMBO, O.; ZNAZEN, A.; SARIH, M.; SOKHNA, C.; RAOULT, D. *Coxiella burnetii*-positive PCR in febrile patients in rural and urban Africa. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 28, p. 107–10, nov. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2014.05.029>>.

ANGELAKIS, E.; MILLION, M.; D'AMATO, F.; ROULI, L.; RICHET, H.; STEIN, A.; ROLAIN, J.-M.; RAOULT, D. Q fever and pregnancy: disease, prevention, and strain specificity. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 361–8, 28 mar. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10096-012-1750-3>>.

ANGELAKIS, E.; RAOULT, D. Q fever. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3–4, p.

297–309, 27 jan. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19875249>>.

ARMENGAUD, A.; KESSALIS, N.; DESENCLOS, J. C.; MAILLOT, E.; BROUSSE, P.; BROUQUI, P.; TIXIER-DUPONT, H.; RAOULT, D.; PROVENSAL, P.; OBADIA, Y. Urban outbreak of Q fever, Briançon, France, March to June 1996. **Eurosurveillance**, v. 2, n. 2, p. pii=137, 1997. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=137>>. Acesso em: 28 ago. 2017.

ARRICAU-BOUVERY, N.; HAUCK, Y.; BEJAOU, A.; FRANGOULIDIS, D.; BODIER, C. C.; SOURIAU, A.; MEYER, H.; NEUBAUER, H.; RODOLAKIS, A.; VERGNAUD, G. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. **BMC microbiology**, v. 6, n. 1, p. 38, 26 abr. 2006. Disponível em: <<http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-6-38>>.

ARRICAU-BOUVERY, N.; SOURIAU, A.; BODIER, C.; DUFOUR, P.; ROUSSET, E.; RODOLAKIS, A. Effect of vaccination with phase I and phase II *Coxiella burnetii* vaccines in pregnant goats. **Vaccine**, v. 23, n. 35, p. 4392–402, 15 ago. 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X05004421>>.

BANAZIS, M. J.; BESTALL, A. S.; REID, S. A.; FENWICK, S. G. A survey of Western Australian sheep, cattle and kangaroos to determine the prevalence of *Coxiella burnetii*. **Veterinary Microbiology**, v. 143, n. 2–4, p. 337–345, 2010.

BARLOW, J.; RAUCH, B.; WELCOME, F.; KIM, S. G.; DUBOVI, E.; SCHUKKEN, Y. Association between *Coxiella burnetii* shedding in milk and subclinical mastitis in dairy cattle. **Veterinary research**, v. 39, n. 3, p. 23, 7 maio 2008. Disponível em: <<http://www.vetres.org/10.1051/vetres:2007060>>.

BAUMGÄRTNER, W.; DETTINGER, H.; SCHMEER, N. Spread and distribution of *Coxiella burnetii* in C57BL/6J (H-2b) and Balb/cJ (H-2d) mice after intraperitoneal infection. **Journal of Comparative Pathology**, v. 108, n. 2, p. 165–184, fev. 1993. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021997508802198>>.

BEARE, P. A.; UNSWORTH, N.; ANDOH, M.; VOTH, D. E.; OMSLAND, A.; GILK, S.

D.; WILLIAMS, K. P.; SOBRAL, B. W.; KUPKO, J. J.; PORCELLA, S. F.; SAMUEL, J. E.; HEINZEN, R. A. Comparative genomics reveal extensive transposon-mediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the genus *Coxiella*. **Infection and immunity**, v. 77, n. 2, p. 642–56, 1 fev. 2009. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.01141-08>>.

BEWLEY, K. R. Animal models of Q fever (*Coxiella burnetii*). **Comparative medicine**, v. 63, n. 6, p. 469–76, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24326221>>.

BILDFELL, R. J.; THOMSON, G. W.; HAINES, D. M.; MCEWEN, B. J.; SMART, N. *Coxiella burnetii* Infection is Associated with Placentitis in Cases of Bovine Abortion. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, n. 5, p. 419–425, set. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11021428>>.

BIRDSSELL, D. N.; PEARSON, T.; PRICE, E. P.; HORNSTRA, H. M.; NERA, R. D.; STONE, N.; GRUENDIKE, J.; KAUFMAN, E. L.; PETTUS, A. H.; HURBON, A. N.; BUCHHAGEN, J. L.; HARMS, N. J.; CHANTURIA, G.; GYURANECZ, M.; WAGNER, D. M.; KEIM, P. S. Melt Analysis of Mismatch Amplification Mutation Assays (Melt-MAMA): A Functional Study of a Cost-Effective SNP Genotyping Assay in Bacterial Models. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e32866, 16 mar. 2012. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0032866>>.

BRANDÃO, H.; VALE, L. A. R.; CRISTOVÃO, D. de A. Investigações sobre a Febre Q em São Paulo. 1. Estudo sorológico em operários de u frigorífico. **Arquivos da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo**, v. 7, n. 1, p. 127–134, 1953.

BROUQUI, P.; DUMLER, J. S.; RAOULT, D. Immunohistologic demonstration of *Coxiella burnetii* in the valves of patients with Q fever endocarditis. **The American journal of medicine**, v. 97, n. 5, p. 451–8, nov. 1994. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0002934394903255>>.

CAPUANO, F.; MANCUSI, A.; CASALINUOVO, F.; PERUGINI, A.; PROROGA, Y.; GUARINO, A.; BERRI, M. Real-time PCR-based detection of *Coxiella burnetii* in cheeses. **European Food Research and Technology**, v. 235, n. 6, p. 1181–1186, 19 dez. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00217-012-1855-z>>.

CARRIERI, M. P.; TISSOT-DUPONT, H.; REY, D.; BROUSSE, P.; RENARD, H.; OBADIA, Y.; RAOULT, D. Investigation of a slaughterhouse-related outbreak of Q fever in the French Alps. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 17–21, 20 jan. 2002. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10096-001-0645-5>>.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories**. 5. ed. Washington D.C.: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health, 2009.

CLAEYS, W. L.; CARDOEN, S.; DAUBE, G.; DE BLOCK, J.; DEWETTINCK, K.; DIERICK, K.; DE ZUTTER, L.; HUYGHEBAERT, A.; IMBERECHTS, H.; THIANGE, P.; VANDENPLAS, Y.; HERMAN, L. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 251–262, 7 maio 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.035>>.

COOPER, A.; HEDLEFS, R.; MCGOWAN, M.; KETHEESAN, N.; GOVAN, B. Serological evidence of *Coxiella burnetii* infection in beef cattle in Queensland. **Australian Veterinary Journal**, v. 89, n. 7, p. 260–264, jul. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-0813.2011.00794.x>>.

COSTA, P. S. G. Da. Serologic evidences of *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae* and *Ehrlichia chaffeensis* infections in healthy individuals and febrile aids and non-AIDS patients from the region of Juiz de Fora,. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 4, p. 208–208, 2005.

COSTA, P. S. G. da; BRIGATTE, M. E.; GRECO, D. B. Questing one Brazilian query: reporting 16 cases of Q fever from Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 1, p. 5–9, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16547572>>.

DAVOUST, B.; MARIÉ, J.-L.; POMMIER DE SANTI, V.; BERENGER, J.-M.; EDOUARD, S.; RAOULT, D. Three-toed sloth as putative reservoir of *Coxiella burnetii*, Cayenne, French Guiana. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 10, p. 1760–1, out. 2014. Disponível em: <<http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/20/10/14->

0694_article.htm>.

DE OLIVEIRA, J. M. B.; ROZENTAL, T.; DE LEMOS, E. R. S.; FORNEAS, D.; ORTEGA-MORA, L. M.; PORTO, W. J. N.; DA FONSECA OLIVEIRA, A. A.; MOTA, R. A. *Coxiella burnetii* in dairy goats with a history of reproductive disorders in Brazil. **Acta Tropica**, v. 183, n. March, p. 19–22, jul. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X17313438>>.

EDOUARD, S.; MAHAMAT, A.; DEMAR, M.; ABBOUD, P.; DJOSSOU, F.; RAOULT, D. Comparison between emerging Q fever in French Guiana and endemic Q fever in Marseille, France. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 90, n. 5, p. 915–9, 7 maio 2014. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.13-0164>>.

EFSA. European Food Safety Authority panel on animal health and welfare: 2010, Scientific opinion on Q fever. **EFSA Journal**, v. 8, n. 5, p. 1–114, 2010. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1595>>.

ELDIN, C.; MÉLENOTTE, C.; MEDIANNIKOV, O.; GHIGO, E.; MILLION, M.; EDOUARD, S.; MEGE, J.-L.; MAURIN, M.; RAOULT, D. From Q Fever to *Coxiella burnetii* Infection: a Paradigm Change. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 115–190, 16 jan. 2017. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/content/30/1/115.full>>.

EMERY, M. P.; OSTLUND, E. N.; AIT ICHOU, M.; BALLIN, J. D.; MCFARLING, D.; MCGONIGLE, L. *Coxiella burnetii* serology assays in goat abortion storm. **Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 26, n. 1, p. 141–5, 14 jan. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/1040638713517233>>.

ENRIGHT, J. B.; SADLER, W. W.; THOMAS, R. C. Pasteurization of Milk Containing the Organism of Q Fever. **American Journal of Public Health and the Nations Health**, v. 47, n. 6, p. 695–700, jun. 1957. Disponível em: <<http://ajph.aphapublications.org/doi/10.2105/AJPH.47.6.695>>.

EPELBOIN, L.; CHESNAIS, C.; BOULLÉ, C.; DROGOUL, A.-S.; RAOULT, D.; DJOSSOU, F.; MAHAMAT, A. Q fever pneumonia in French Guiana: prevalence, risk factors, and prognostic score. **Clinical infectious diseases: an official publication**

of the Infectious Diseases Society of America, v. 55, n. 1, p. 67–74, 1 jul. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22441648>>.

FOURNIER, P. E.; CASALTA, J. P.; HABIB, G.; MESSANA, T.; RAOULT, D. Modification of the diagnostic criteria proposed by the Duke Endocarditis Service to permit improved diagnosis of Q fever endocarditis. **The American journal of medicine**, v. 100, n. 6, p. 629–33, jun. 1996. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000293439600040X>>.

FOURNIER, P. E.; MARRIE, T. J.; RAOULT, D. Diagnosis of Q fever. **Journal of clinical microbiology**, v. 36, n. 7, p. 1823–34, jul. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9650920>>.

GAMA, J. A.; ABBY, S. S.; VIEIRA-SILVA, S.; DIONISIO, F.; ROCHA, E. P. C. Immune subversion and quorum-sensing shape the variation in infectious dose among bacterial pathogens. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 2, p. e1002503, 2 fev. 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1002503>>.

GEORGIEV, M.; AFONSO, A.; NEUBAUER, H.; NEEDHAM, H.; THIÉRY, R.; RODOLAKIS, A.; ROEST, H. J.; STÄRK, K. D.; STEGEMAN, J. A.; VELLEMA, P.; VAN DER HOEK, W.; MORE, S. J. **Q fever in humans and farm animals in four European countries, 1982 to 2010** *Eurosurveillance*, 2013. .

GIKAS, A.; KOFTERIDIS, D.; BOUROS, D.; VOLOUDAKI, A.; TSELENTIS, Y.; TSAPARAS, N. Q fever pneumonia: appearance on chest radiographs. **Radiology**, v. 210, n. 2, p. 339–43, fev. 1999. Disponível em: <<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=10207412&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/uuid/1FFB0EEC-03F3-43EA-B90D-5F99E21097A6>>.

GLAZUNOVA, O.; ROUX, V.; FREYLIKMAN, O.; SEKEYOVA, Z.; FOURNOUS, G.; TYCZKA, J.; TOKAREVICH, N.; KOVACAVA, E.; MARRIE, T. J.; RAOULT, D. *Coxiella burnetii* genotyping. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 8, p. 1211–7, ago. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16102309>>.

GUATTEO, R.; BEAUDEAU, F.; BERRI, M.; RODOLAKIS, A.; JOLY, A.; SEEGER, H. Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and

control. **Veterinary research**, v. 37, n. 6, p. 827–33, 15 nov. 2006. Disponível em: <<http://www.edpsciences.org/10.1051/vetres:2006038>>.

GUATTEO, R.; JOLY, A.; BEAUDEAU, F. Shedding and serological patterns of dairy cows following abortions associated with *Coxiella burnetii* DNA detection. **Veterinary Microbiology**, v. 155, n. 2–4, p. 430–433, 23 mar. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.09.026>>.

GUATTEO, R.; SEEGER, H.; JOLY, A.; BEAUDEAU, F. Prevention of *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy herds using a phase I *C. burnetii* inactivated vaccine. **Vaccine**, v. 26, n. 34, p. 4320–8, 12 ago. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X08007603>>.

GUATTEO, R.; SEEGER, H.; TAUREL, A. F.; JOLY, A.; BEAUDEAU, F. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: A critical review. **Veterinary Microbiology**, v. 149, n. 1–2, p. 1–16, 2011.

GÜRTLER, L.; BAUERFEIND, U.; BLÜMEL, J.; BURGER, R.; DROSTEN, C.; GRÖNER, A.; HEIDEN, M.; HILDEBRANDT, M.; JANSEN, B.; OFFERGELD, R.; PAULI, G.; SEITZ, R.; SCHLENKRICH, U.; SCHOTTSTEDT, V.; STROBEL, J.; WILLKOMMEN, H. *Coxiella burnetii* - Pathogenic Agent of Q (Query) Fever. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 41, n. 1, p. 2–2, fev. 2014. Disponível em: <<http://www.karger.com?doi=10.1159/000357107>>.

HARRIS, P.; EALES, K. M.; SQUIRES, R.; GOVAN, B.; NORTON, R. Acute Q fever in northern Queensland: variation in incidence related to rainfall and geographical location. **Epidemiology and Infection**, v. 141, p. 1034–1038, 2013.

HAWKER, J. I.; AYRES, J. G.; BLAIR, I.; EVANS, M. R.; SMITH, D. L.; SMITH, E. G.; BURGE, P. S.; CARPENTER, M. J.; CAUL, E. O.; COUPLAND, B.; DESSELBERGER, U.; FARRELL, I. D.; SAUNDERS, P. J.; WOOD, M. J. A large outbreak of Q fever in the West Midlands: windborne spread into a metropolitan area? **Communicable Disease and Public Health**, v. 1, n. 3, p. 180–187, 1998. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Jon_Ayres/publication/13502962_A_large_outbreak_of_Q_fever_in_the_West_Midlands_windborne_spread_into_a_metropolitan_area/links/09e4150c05597897c9000000/A-large-outbreak-of-Q-fever-in-the-West->

Midlands-windborne-spread>.

HENDRIX, L.; SAMUEL, J.; MALLAVIA, L. Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by analysis of restriction-endonuclease-digested DNA separated by SDS-PAGE. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 269–276, 1990. Disponível em: <<http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/137/2/mic-137-2-269.pdf?expires=1510208545&id=id&accname=guest&checksum=FFD97A8336747B3675B7FBF7C4DC9C4B>>.

HOGERWERF, L.; VAN DEN BROM, R.; ROEST, H. I. J.; BOUMA, A.; VELLEMA, P.; PIETERSE, M.; DERCKSEN, D.; NIELEN, M. Reduction of *Coxiella burnetii* prevalence by vaccination of goats and sheep, The Netherlands. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 3, p. 379–86, mar. 2011. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/3/10-1157_article.htm>.

HORIGAN, M. W.; BELL, M. M.; POLLARD, T. R.; SAYERS, A. R.; PRITCHARD, G. C. Q fever diagnosis in domestic ruminants: comparison between complement fixation and commercial enzyme-linked immunosorbent assays. **Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 23, n. 5, p. 924–31, 9 set. 2011. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1040638711416971>>.

HORNSTRA, H. M.; PRIESTLEY, R. A.; GEORGIA, S. M.; KACHUR, S.; BIRDSELL, D. N.; HILSABECK, R.; GATES, L. T.; SAMUEL, J. E.; HEINZEN, R. A.; KERSH, G. J.; KEIM, P.; MASSUNG, R. F.; PEARSON, T. Rapid typing of *Coxiella burnetii*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, 2011.

IMBERT, G.; LA SCOLA, B. Diagnosis of Q Fever Using Indirect Microimmunofluorescence. In: **Diagnostic Bacteriology Protocols**. New Jersey: Humana Press, 2006. 345p. 197–202.

JAGER, C.; WILLEMS, H.; THIELE, D.; BALJER, G. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates. **Epidemiology & Infection**, v. 120, p. 157–164, 1998. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1017/S0950268897008510>>.

JONES, R. M.; TWOMEY, D. F.; HANNON, S.; ERRINGTON, J.; PRITCHARD, G.

C.; SAWYER, J. Detection of *Coxiella burnetii* in placenta and abortion samples from British ruminants using real-time PCR. **The Veterinary record**, v. 167, n. 25, p. 965–7, 18 dez. 2010. Disponível em: <<http://veterinaryrecord.bmj.com/cgi/doi/10.1136/vr.c4040>>.

JOULIÉ, A.; SIDI-BOUMEDINE, K.; BAILLY, X.; GASQUI, P.; BARRY, S.; JAFFRELO, L.; PONCET, C.; ABRIAL, D.; YANG, E.; LEBLOND, A.; ROUSSET, E.; JOURDAIN, E. Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* in French livestock reveals the existence of three main genotype clusters and suggests species-specific associations as well as regional stability. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 48, p. 142–149, mar. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.015>>.

KAECH, C.; PACHE, I.; RAOULT, D.; GREUB, G. *Coxiella burnetii* as a possible cause of autoimmune liver disease: a case report. **Journal of medical case reports**, v. 3, n. 1, p. 8870, 10 ago. 2009. Disponível em: <<http://www.jmedicalcasereports.com/content/3/1/8870>>.

KARLSSON, E.; MACELLARO, A.; BYSTRÖM, M.; FORSMAN, M.; FRANGOULIDIS, D.; JANSE, I.; LARSSON, P.; LINDGREN, P.; ÖHRMAN, C.; VAN ROTTERDAM, B.; SJÖDIN, A.; MYRTENNÄS, K. Eight new genomes and synthetic controls increase the accessibility of rapid melt-MAMA SNP typing of *Coxiella burnetii*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

KAUFMANN, A. F.; FOX, M. D.; BOYCE, J. M.; ANDERSON, D. C.; POTTER, M. E.; MARTONE, W. J.; PATTON, C. M. Airborne spread of brucellosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 353, n. 1, p. 105–114, dez. 1980. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.1980.tb18912.x>>.

KOMIYA, T.; SADAMASU, K.; TORINIWA, H.; KATO, K.; ARASHIMA, Y.; FUKUSHI, H.; HIRAI, K.; ARAKAWA, Y. Epidemiological survey on the route of *Coxiella burnetii* infection in an animal hospital. **Journal of infection and chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy**, v. 9, n. 2, p. 151–5, jun. 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10156-003-0237-7>>.

LA SCOLA, B.; RAOULT, D. Serological cross-reactions between *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae*, and *Coxiella burnetii*. **Journal of clinical**

microbiology, v. 34, n. 9, p. 2270–4, set. 1996. Disponível em: <<http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0343069894&partnerID=40&rel=R7.0.0>>.

LAMAS, C. C.; MARES-GUIA, M. A.; ROZENTAL, T.; MOREIRA, N.; FAVACHO, A. R. M.; BARREIRA, J.; GUTERRES, A.; BÓIA, M. N.; DE LEMOS, E. R. S. Bartonella spp. infection in HIV positive individuals, their pets and ectoparasites in Rio de Janeiro, Brazil: serological and molecular study. **Acta tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 137–41, jul. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X10000574>>.

LAMAS, C. C.; ROZENTAL, T.; BÓIA, M. N.; FAVACHO, A. R. M.; KIRSTEN, A. H.; DA SILVA, A. P. M.; DE LEMOS, E. R. S. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in human immunodeficiency virus-positive patients in Jacarepaguá, Rio de Janeiro, Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 140–141, dez. 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14635175>>.

LAMAS, C. da C.; RAMOS, R. G.; LOPES, G. Q.; SANTOS, M. S.; GOLEBIOVSKI, W. F.; WEKSLER, C.; FERRAIUOLI, G. I. D.; FOURNIER, P.-E.; LEPIDI, H.; RAOULT, D. 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 : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. e65-6, jan. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2012.10.009>>.

LEE, M.; JANG, J. J.; KIM, Y. S.; LEE, S.-O.; CHOI, S.-H.; KIM, S.-H.; YU, E. Clinicopathologic Features of Q Fever Patients with Acute Hepatitis. **Korean Journal of Pathology**, v. 46, n. 1, p. 10, 2012. Disponível em: <<http://www.jpathol.tn.org/journal/view.php?doi=10.4132/KoreanJPathol.2012.46.1.10>>.

LEMOS, E. R. S.; ROZENTAL, T.; MARES-GUIA, M. A. M.; ALMEIDA, D. N. P.; MOREIRA, N.; SILVA, R. G.; BARREIRA, J. D.; LAMAS, C. C.; FAVACHO, A. R.; DAMASCO, P. V. 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 (Larchmont, N.Y.)**, v. 11, n. 1, p. 85–87, 2011.

LEMOS, E. R. S.; ROZENTAL, T.; SIQUEIRA, B. N.; JÚNIOR, A. A. P.; JOAQUIM, T. E.; DA SILVA, R. G.; LEITE, C. de A.; ARANTES, A. A.; DA CUNHA, M. F.; BORGHI, D. P. Q Fever in Military Firefighters during Cadet Training in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 2, p. 303–305, 2 ago. 2018. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.17-0979>>.

LLOYD-SMITH, J. O.; LLOYD-SMITH, J. O.; GEORGE, D.; PEPIN, K. M.; PITZER, V. E.; PULLIAM, J. R. C.; DOBSON, A. P.; HUDSON, P. J.; GRENFELL, B. T. Epidemic Dynamics at the Human-Animal Interface. v. 1362, n. 2009, 2013.

MAGALHÃES, O. de. Contribuição para o conhecimento das doenças do grupo tifo exantemático no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 54, n. 1, p. 279–306, jun. 1956. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761956000100012&lng=pt&tlng=pt>.

MARES-GUIA, M. A. M. de M. **Febre Q: pacientes suspeitos de dengue, animais domésticos, animais silvestres e artrópodes no Estado do Rio de Janeiro**. 2015. Instituto Oswaldo Cruz, 2015.

MARES-GUIA, M. A. M. de M.; ROZENTAL, T.; GUTERRES, A.; GOMES, R.; ALMEIDA, D. N. de; MOREIRA, N. S.; BARREIRA, J. D.; FAVACHO, A. R.; SANTANA, A. L.; LEMOS, E. R. S. de. 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**, v. 47, n. 2, p. 231–4, abr. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822014000200231&lng=en&tlng=en>.

MARES-GUIA, M. A. M. M.; ROZENTAL, T.; GUTERRES, A.; FERREIRA, M. D. S.; BOTTICINI, R. D. G.; TERRA, A. K. C.; MARRASCHI, S.; BOCHNER, R.; LEMOS, E. R. S. Molecular Identification of Q Fever in Patients with a Suspected Diagnosis of Dengue in Brazil in 2013-2014. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 94, n. 5, p. 1090–4, 4 maio 2016. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/cgi/doi/10.4269/ajtmh.15-0575>>.

MARRIE, T. J. Q fever - A review. **Canadian Veterinary Journal**, v. 31, n. August, p. 555–563, 1990.

MARRIE, T. J.; MINNICK, M. F.; TEXTORIS, J.; CAPO, C.; MEGE, J.-L. Coxiella. In: TANG, Y.-W.; SUSSMAN, M.; LIU, D.; POXTON, I.; SCHWARTZMAN, J. (Ed.). **Molecular Medical Microbiology**. Second ed. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 1941–1972.

MARRIE, T. J.; RAOULT, D. Q fever--a review and issues for the next century. **International journal of antimicrobial agents**, v. 8, n. 3, p. 145–61, jan. 1997. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092485799600369X>>.

MAURIN, M.; RAOULT, D. Q Fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 518–553, 1 out. 1999. Disponível em: <<http://pubget.com/site/paper/10515901?institution=%5Cnpapers2://publication/uuid/DBB0F09F-08EB-47B3-96DF-5BA8C2C6971B>>.

MCDANIEL, C. J.; CARDWELL, D. M.; MOELLER, R. B.; GRAY, G. C. Humans and cattle: a review of bovine zoonoses. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 14, n. 1, p. 1–19, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3880910&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

MCLAUGHLIN, H. P.; CHERNEY, B.; HAKOVIRTA, J. R.; PRIESTLEY, R. A.; CONLEY, A.; CARTER, A.; HODGE, D.; PILLAI, S. P.; WEIGEL, L. M.; KERSH, G. J.; SUE, D. Phylogenetic inference of *Coxiella burnetii* by 16S rRNA gene sequencing. **PLOS ONE**, v. 12, n. 12, p. e0189910, 29 dez. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5747434/pdf/pone.0189910.pdf>>.

MCQUISTON, J. H.; CHILDS, J. E. Q Fever in Humans and Animals in the United States. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 2, n. 3, p. 179–191, set. 2002. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/15303660260613747>>.

MCQUISTON, J. H.; HOLMAN, R. C.; MCCALL, C. L.; CHILDS, J. E.; SWERDLOW, D. L.; THOMPSON, H. A. National surveillance and the epidemiology of human Q fever in the United States, 1978-2004. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 75, n. 1, p. 36–40, jul. 2006. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/cgi/content/abstract/75/1/36>>.

MELENOTTE, C.; LEPIDI, H.; NAPPEZ, C.; BECHAH, Y.; AUDOLY, G.; TERRAS, J.;

RAOULT, D.; BRÉGEON, F. Mouse Model of *Coxiella burnetii* Aerosolization. **Infection and immunity**, v. 84, n. 7, p. 2116–23, jul. 2016. Disponível em: <<http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.00108-16>>.

MUSSO, D.; RAOULT, D. Serological cross-reactions between *Coxiella burnetii* and *Legionella micdadei*. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 4, n. 2, p. 208–12, mar. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9067657>>.

NIELSEN, K.; DUNCAN, J. R. **Animal brucellosis**. [s.l.] CRC Press, 1990.

NIEMCZUK, K.; SZYMAŃSKA-CZERWIŃSKA, M.; ŚMIETANKA, K.; BOCIAN, Ł. Comparison of diagnostic potential of serological, molecular and cell culture methods for detection of Q fever in ruminants. **Veterinary microbiology**, v. 171, n. 1–2, p. 147–52, 25 jun. 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113514001655>>.

NIEMCZUK, K.; SZYMAŃSKA-CZERWIŃSKA, M.; ZARZECKA, A.; KONARSKA, H. Q fever in a cattle herd and humans in the south-eastern Poland. Laboratory diagnosis of the disease using serological and molecular methods. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 55, n. 4, p. 593–598, 2011.

NOGUERA, A. de F. **Evidência sorológica de infecção por Bartonella spp., Coxiella burnetii e Hantavirus em profissionais de um abrigo de animais no município do Rio de Janeiro**. 2015. Instituto Oswaldo Cruz, 2015.

NUSINOVICI, S.; HOCH, T.; BRAHIM, M. L.; JOLY, A.; BEAUDEAU, F. The Effect of Wind on *Coxiella burnetii* Transmission Between Cattle Herds: a Mechanistic Approach. **Transboundary and emerging diseases**, n. 2014, p. n/a-n/a, 22 set. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/tbed.12423>>.

OIE. Q Fever. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. Paris: World Organisation for Animal Health, 2018. p. 1–18.

OMSLAND, A.; COCKRELL, D. C.; HOWE, D.; FISCHER, E. R.; VIRTANEVA, K.; STURDEVANT, D. E.; PORCELLA, S. F.; HEINZEN, R. A. Host cell-free growth of the Q fever bacterium *Coxiella burnetii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 11, p. 4430–4, 17 mar. 2009. Disponível em:

<<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=19246385&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/doi/10.1073/pnas.0812074106>>

ORDI-ROS, J.; SELVA-O'CALLAGHAN, A.; MONEGAL-FERRAN, F.; MONASTERIO-ASPIRI, Y.; JUSTE-SANCHEZ, C.; VILARDELL-TARRES, M. Prevalence, significance, and specificity of antibodies to phospholipids in Q fever. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 18, n. 2, p. 213–8, 1 fev. 1994. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/clinids/18.2.213>>.

PACHECO, R. C.; ECHAIDE, I. E.; ALVES, R. N.; BELETTI, M. E.; NAVA, S.; LABRUNA, M. B. *Coxiella burnetii* in ticks, Argentina. **Emerging infectious diseases**, v. 19, n. 2, p. 344–6, fev. 2013. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/2/12-0362_article.htm>.

PEARSON, T.; HORNSTRA, H. M.; HILSABECK, R.; GATES, L. T.; OLIVAS, S. M.; BIRDSELL, D. M.; HALL, C. M.; GERMAN, S.; COOK, J. M.; SEYMOUR, M. L.; PRIESTLEY, R. A.; KONDAS, A. V.; CLARK FRIEDMAN, C. L.; PRICE, E. P.; SCHUPP, J. M.; LIU, C. M.; PRICE, L. B.; MASSUNG, R. F.; KERSH, G. J.; KEIM, P. High prevalence and two dominant host-specific genotypes of *Coxiella burnetii* in U.S. milk. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2014.

PENTTILA, I. A.; HARRIS, R. J.; STORM, P.; HAYNES, D.; WORSWICK, D. A.; MARMION, B. P. Cytokine dysregulation in the post-Q-fever fatigue syndrome. **QJM : monthly journal of the Association of Physicians**, v. 91, n. 8, p. 549–60, ago. 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9893758>.

PIÑERO, A.; BARANDIKA, J. F.; HURTADO, A.; GARCÍA-PÉREZ, A. L. Evaluation of *Coxiella burnetii* Status in Dairy Cattle Herds with Bulk-tank Milk Positive by ELISA and PCR. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 61, n. 2, p. 163–168, abr. 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/tbed.12013>>.

PORTEN, K.; RISSLAND, J.; TIGGES, A.; BROLL, S.; HOPP, W.; LUNEMANN, M.; VAN TREECK, U.; KIMMIG, P.; BROCKMANN, S. O.; WAGNER-WIENING, C.;

HELLENBRAND, W.; BUCHHOLZ, U. A super-spreading ewe infects hundreds with Q fever at a farmers' market in Germany. **BMC infectious diseases**, v. 6, n. 1, p. 147, 6 out. 2006. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1618839&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

RAOULT, D. Rickettsial Infections. In: GOLDMAN, L.; SCHAFER, A. I. (Ed.). **Goldman's Cecil Medicine**. 24th. ed. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 1954–1964.

RIBEIRO-NETO, A.; NIKITIN, T.; RIBEIRO, I. F. Estudo sobre a Febre Q em Sao Paulo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 6, n. 6, p. 255–257, 1964.

RIEMANN, H. P.; BRANT, P. C.; BEHYMER, D. E.; FRANTI, C. E. Toxoplasma gondii and Coxiella burnetii antibodies among Brazilian slaughterhouse employees. **Am J Epidemiol**, v. 102, n. 5, p. 386–393, 1975. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1200023>.

RIEMANN, H. P.; BRANT, P. C.; FRANTI, C. E.; REIS, R.; BUCHANAN, a M.; STORMONT, C.; BEHYMER, D. E. Antibodies to Toxoplasma gondii and Coxiella burnetii among students and other personnel in veterinary colleges in California and Brazil. **American journal of epidemiology**, v. 100, n. 3, p. 197–208, 1974. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4606228>>.

RODOLAKIS, A. Q Fever in dairy animals. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, n. 1, p. 90–3, maio 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2009.04511.x>>.

RODOLAKIS, A.; BERRI, M.; HÉCHARD, C.; CAUDRON, C.; SOURIAU, A.; BODIER, C. C.; BLANCHARD, B.; CAMUSET, P.; DEVILLECHAISE, P.; NATORP, J. C.; VADET, J. P.; ARRICAU-BOUVERY, N. Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine, and ovine herds. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 12, p. 5352–5360, 2007.

ROEST, H. I. J.; RUULS, R. C.; TILBURG, J. J. H. C.; NABUURS-FRANSSSEN, M. H.; KLAASSEN, C. H. W.; VELLEMA, P.; VAN DEN BROM, R.; DERCKSEN, D.;

WOUDA, W.; SPIERENBURG, M. A. H.; VAN DER SPEK, A. N.; BUIJS, R.; DE BOER, A. G.; WILLEMSSEN, P. T. J.; VAN ZIJDERVELD, F. G. Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* from ruminants in Q fever outbreak, the Netherlands. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 4, p. 668–75, abr. 2011a. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/4/10-1562_article.htm>.

ROEST, H. I. J.; TILBURG, J. J. H. C.; VAN DER HOEK, W.; VELLEMA, P.; VAN ZIJDERVELD, F. G.; KLAASSEN, C. H. W.; RAOULT, D. The Q fever epidemic in The Netherlands: history, onset, response and reflection. **Epidemiology and infection**, v. 139, n. 1, p. 1–12, 5 jan. 2011b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20920383>>.

ROLAIN, J.-M.; RAOULT, D. Molecular detection of *Coxiella burnetii* in blood and sera during Q fever. **QJM: monthly journal of the Association of Physicians**, v. 98, n. 8, p. 615–7–20, 13 ago. 2005. Disponível em: <<https://academic.oup.com/qjmed/article-lookup/doi/10.1093/qjmed/hci099>>.

ROUSSET, É.; CREMOUX, R. de; BRONNER, A.; JOURDAIN, E.; TOURATIER, A.; SIDI-BOUMEDINE, K. La fièvre Q. **Bulletin des GTV - Hors Série “Zoonose : Maladies bactériennes”**, n. 1, p. 53–67, 2012.

ROZENTAL, T.; FERREIRA, M. S.; GUTERRES, A.; MARES-GUIA, M. A.; TEIXEIRA, B. R.; GONÇALVES, J.; BONVICINO, C. R.; D'ANDREA, P. S.; DE LEMOS, E. R. S. Zoonotic pathogens in Atlantic Forest wild rodents in Brazil: Bartonella and Coxiella infections. **Acta Tropica**, v. 168, n. 16, p. 64–73, abr. 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X16305708>>.

ROZENTAL, T.; MASCARENHAS, L. F.; ROZENBAUM, R.; GOMES, R.; MATTOS, G. S.; MAGNO, C. C.; ALMEIDA, D. N.; ROSSI, M. I. D.; FAVACHO, A. R. M.; DE LEMOS, E. R. S. *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**, v. 107, n. 5, p. 695–7, ago. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762012000500021&lng=en&tling=en>.

RUSSELL-LODRIGUE, K. E.; ANDOH, M.; POELS, M. W. J.; SHIVE, H. R.; WEEKS,

B. R.; ZHANG, G. Q.; TERSTEEG, C.; MASEGI, T.; HOTTA, A.; YAMAGUCHI, T.; FUKUSHI, H.; HIRAI, K.; MCMURRAY, D. N.; SAMUEL, J. E. *Coxiella burnetii* isolates cause genogroup-specific virulence in mouse and guinea pig models of acute Q fever. **Infection and immunity**, v. 77, n. 12, p. 5640–50, 1 dez. 2009. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.00851-09>>.

SAMUEL, J. E.; FRAZIER, M. E.; MALLAVIA, L. P. Correlation of plasmid type and disease caused by *Coxiella burnetii*. **Infection and Immunity**, v. 49, n. 3, p. 775–779, 1985.

SCHÄRRER, S. **The slaughterhouse as data source for monitoring programmes of cattle by**. 2014. Universidade de Basel, 2014. Disponível em: <http://edoc.unibas.ch/diss/DissB_11553>.

SCHNEEBERGER, P. M.; HERMANS, M. H. A.; VAN HANNEN, E. J.; SCHELLEKENS, J. J. A.; LEENDERS, A. C. A. P.; WEVER, P. C. Real-time PCR with serum samples is indispensable for early diagnosis of acute Q fever. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 17, n. 2, p. 286–90, 1 fev. 2010. Disponível em: <<http://cvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/CVI.00454-09>>.

SCHNEEBERGER, P. M.; WINTENBERGER, C.; VAN DER HOEK, W.; STAHL, J. P. Q fever in the Netherlands - 2007-2010: what we learned from the largest outbreak ever. **Medecine et maladies infectieuses**, v. 44, n. 8, p. 339–53, ago. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2014.02.006>>.

SEITZ, R. *Coxiella burnetii* - Pathogenic Agent of Q (Query) Fever. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 41, n. 1, p. 60–72, 2014.

SEKEYOVÁ, Z.; ROUX, V.; RAOULT, D. Intraspecies diversity of *Coxiella burnetii* as revealed by com1 and mucZ sequence comparison. **FEMS Microbiology Letters**, v. 180, n. 1, p. 61–67, 1999.

SESHADRI, R.; PAULSEN, I. T.; EISEN, J. A.; READ, T. D.; NELSON, K. E.; NELSON, W. C.; WARD, N. L.; TETTELIN, H.; DAVIDSEN, T. M.; BEANAN, M. J.; DEBOY, R. T.; DAUGHERTY, S. C.; BRINKAC, L. M.; MADUPU, R.; DODSON, R. J.; KHOURI, H. M.; LEE, K. H.; CARTY, H. A.; SCANLAN, D.; HEINZEN, R. A.; THOMPSON, H. A.; SAMUEL, J. E.; FRASER, C. M.; HEIDELBERG, J. F. Complete

genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 9, p. 5455–5460, 29 abr. 2003. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0931379100>>.

SICILIANO, R. F.; CASTELLI, J. B.; MANSUR, A. J.; PEREIRA DOS SANTOS, F.; COLOMBO, S.; DO NASCIMENTO, E. M.; PADDOCK, C. D.; BRASIL, R. A.; VELHO, P. E. N. F.; DRUMMOND, M. R.; GRINBERG, M.; STRABELLI, T. M. V. Bartonella spp. and *Coxiella burnetii* Associated with Community-Acquired, Culture-Negative Endocarditis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 8, p. 1429–1432, ago. 2015. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/8/14-0343_article.htm>.

SICILIANO, R. F.; RIBEIRO, H. B.; FURTADO, R. H. D. M.; CASTELLI, J. B.; SAMPAIO, R. O.; DOS SANTOS, F. C. P.; COLOMBO, S.; GRINBERG, M.; STRABELLI, T. M. V. Endocardite por *Coxiella burnetii* (febre Q). Doença rara ou pouco diagnosticada? Relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 409–412, 2008.

SICILIANO, R. F.; STRABELLI, T. M.; ZEIGLER, R.; RODRIGUES, C.; CASTELLI, J. B.; GRINBERG, M.; COLOMBO, S.; DA SILVA, L. J.; MENDES DO NASCIMENTO, E. M.; PEREIRA DOS SANTOS, F. C.; UIP, D. E. Infective endocarditis due to Bartonella spp. and *Coxiella burnetii*: experience at a cardiology hospital in Sao Paulo, Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, n. 1, p. 215–22, 1 out. 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1196/annals.1374.123>>.

SRIGLEY, J. R.; VELLEND, H.; PALMER, N.; PHILLIPS, M. J.; GEDDIE, W. R.; VAN NOSTRAND, A. W.; EDWARDS, V. D. Q-fever. The liver and bone marrow pathology. **The American journal of surgical pathology**, v. 9, n. 10, p. 752–758, 1985.

STEIN, A.; LEPIDI, H.; MEGE, J. L.; MARRIE, T. J.; RAOULT, D. Repeated pregnancies in BALB/c mice infected with *Coxiella burnetii* cause disseminated infection, resulting in stillbirth and endocarditis. **The Journal of infectious diseases**, v. 181, n. 1, p. 188–94, jan. 2000. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/315166>>.

STEIN, A.; LOUVEAU, C.; LEPIDI, H.; RICCI, F.; BAYLAC, P.; DAVOUST, B.; RAOULT, D. Q Fever Pneumonia: Virulence of *Coxiella burnetii* Pathovars in a Murine Model of Aerosol Infection. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 2469–2477, 1 abr. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15784593>>.

STEIN, A.; SAUNDERS, N. A.; TAYLOR, A. G.; RAOULT, D. Phylogenetic homogeneity of *Coxiella burnetii* strains as determined by 16S ribosomal RNA sequencing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 113, n. 3, p. 339–344, 1993.

STEVENSON, S.; GOWARDMAN, J.; TOZER, S.; WOODS, M. Life-threatening Q fever infection following exposure to kangaroos and wallabies. **BMJ case reports**, v. 2015, p. bcr2015210808, 17 set. 2015. Disponível em: <<http://casereports.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bcr-2015-210808>>.

SVRAKA, S.; TOMAN, R.; SKULTETY, L.; SLABA, K.; HOMAN, W. L. Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 254, n. 2, p. 268–274, 2006.

TAYLOR, L. H.; LATHAM, S. M.; WOOLHOUSE, M. E. Risk factors for human disease emergence. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 356, n. 1411, p. 983–9, 29 jul. 2001. Disponível em: <<http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2001.0888>>.

TISSOT-DUPONT, H.; AMADEI, M.; NEZRI, M.; RAOULT, D. Wind in November , Q fever in December. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 7, p. 1264–1269, 2004. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/10/7/03-0724_article>.

TO, H.; HTWE, K. K.; KAKO, N.; KIM, H. J.; YAMAGUCHI, T.; FUKUSHI, H.; HIRAI, K. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle with reproductive disorders. **The Journal of veterinary medical science**, v. 60, n. 7, p. 859–61, jul. 1998. Disponível em: <<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jvms/60.859?from=CrossRef>>.

TOMAN, R.; HEINZEN, R. A.; SAMUEL, J. E.; MEGE, J.-L. ***Coxiella burnetii: Recent Advances and New Perspectives in Research of the Q Fever Bacterium.*** 1st. ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012.

VAIDYA, V. M.; MALIK, S. V. S.; BHILEGAONKAR, K. N.; RATHORE, R. S.; KAUR, S.; BARBUDDHE, S. B. Prevalence of Q fever in domestic animals with reproductive

disorders. “**Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**”, v. 33, n. 4, p. 307–321, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2008.10.006>>.

VALLE, L. A. R.; BRANDÃO, H.; CRISTOVÃO, D. de A.; D’APICE, M. Investigações sobre a Febre Q em São Paulo . 2. Estudos em tratadores de gado e em bovinos. **Arquivos da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo**, v. 9, n. 1/2, p. 167–180, 1955.

VAN DEN BROM, R.; VAN ENGELEN, E.; ROEST, H. I. J.; VAN DER HOEK, W.; VELLEMA, P. *Coxiella burnetii* infections in sheep or goats: an opinionated review. **Veterinary microbiology**, v. 181, n. 1–2, p. 119–29, 14 dez. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.011>>.

VAN NGUYEN, S.; HIRAI, K. Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by sequence determination and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of isocitrate dehydrogenase gene. **FEMS Microbiology Letters**, v. 180, n. 2, p. 249–254, 1999.

VAN DERBURG, S.; RUBACH, M. P.; HALLIDAY, J. E. B.; CLEAVELAND, S.; REDDY, E. A.; CRUMP, J. A. Epidemiology of *Coxiella burnetii* Infection in Africa: A OneHealth Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. e2787, 10 abr. 2014. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002787>>.

VINCENT, G. A.; GRAVES, S. R.; ROBSON, J. M.; NGUYEN, C.; HUSSAIN-YUSUF, H.; ISLAM, A.; FENWICK, S. G.; STENOS, J. Isolation of *Coxiella burnetii* from serum of patients with acute Q fever. **Journal of microbiological methods**, v. 119, p. 74–8, dez. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2015.10.008>>.

VOTH, D. E.; BEARE, P. A.; HOWE, D.; SHARMA, U. M.; SAMOILIS, G.; COCKRELL, D. C.; OMSLAND, A.; HEINZEN, R. A. The *Coxiella burnetii* cryptic plasmid is enriched in genes encoding type IV secretion system substrates. **Journal of bacteriology**, v. 193, n. 7, p. 1493–503, 1 abr. 2011. Disponível em: <<http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.01359-10>>.

WEGDAM-BLANS, M. C. A.; KAMPSCHREUR, L. M.; DELSING, C. E.; BLEEKER-

ROVERS, C. P.; SPRONG, T.; VAN KASTEREN, M. E. E.; NOTERMANS, D. W.; RENDERS, N. H. M.; BIJLMER, H. A.; LESTRADE, P. J.; KOOPMANS, M. P. G.; NABUURS-FRANSSEN, M. H.; OOSTERHEERT, J. J.; DUTCH Q FEVER CONSENSUS GROUP. Chronic Q fever: review of the literature and a proposal of new diagnostic criteria. **The Journal of infection**, v. 64, n. 3, p. 247–59, mar. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22226692>>.

WIELDERS, C. C. H.; WIJNBERGEN, P. C. A.; RENDERS, N. H. M.; SCHELLEKENS, J. J. A.; SCHNEEBERGER, P. M.; WEVER, P. C.; HERMANS, M. H. A. High *Coxiella burnetii* DNA load in serum during acute Q fever is associated with progression to a serologic profile indicative of chronic Q fever. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 10, p. 3192–8, 1 out. 2013. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00993-13>>.

WOOLHOUSE, M. E. J.; GOWTAGE-SEQUERIA, S. Host range and emerging and reemerging pathogens. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 12, p. 1842–7, dez. 2005. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/11/12/05-0997_article.htm>.