



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA

THAINÁ VALENTE BERTOZZO

DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA *Coxiella burnetii* EM LEITE  
BOVINO COLETADO DE TANQUES DE REFRIGERAÇÃO DE  
PEQUENAS PROPRIEDADES E ANÁLISE ESPACIAL

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais.

Orientadora: Dra. Simone Baldini Lucheis

Coorientadora: Dra. Maria Izabel Merino de Medeiros

Botucatu

2024

THAINÁ VALENTE BERTOZZO

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA *Coxiella burnetii* EM  
LEITE BOVINO COLETADO DE TANQUES DE  
REFRIGERAÇÃO DE PEQUENAS PROPRIEDADES E  
ANÁLISE ESPACIAL**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Doutora em DoençasTropicais.

Orientadora: Dra. Simone Baldini Lucheis

Coorientadora: Dra. Maria Izabel Merino de Medeiros

Botucatu

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Bertozzo, Thainá Valente.

Diagnóstico molecular para *Coxiella burnetii* em leite bovino coletado de tanques de refrigeração de pequenas propriedades e análise espacial / Thainá Valente Bertozzo. - Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Simone Baldini Lucheis  
Coorientador: Maria Izabel Merino de Medeiros  
Capes: 40101096

1. Bovinos. 2. Diagnóstico molecular. 3. Febre Q. 4. Georreferenciamento. 5. Leite. 6. Bovinos de leite.

Palavras-chave: Bovinos; Diagnóstico molecular; Febre Q; Georreferenciamento; Leite de vaca.

**Thainá Valente Bertozzo**

**Diagnóstico molecular para *Coxiella burnetii* em leite bovino coletado de tanques de refrigeração de pequenas propriedades e análise espacial**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de doutora em Doenças Tropicais.

**Orientadora:** Profa. Dra Simone Baldini Lucheis

**Comissão examinadora :**

---

Profa. Dra Érica Boarato David

---

Prof. Dr Mateus Ribeiro de Souza Mioni

---

Profa. Dra. Vera Curci Magalhães

---

Profa. Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira

Botucatu, 08 de fevereiro de 2024

## *Dedicatória*

*Dedico este trabalho à Deus, aos meus pais e  
irmã, e ao meu companheiro Victor;  
fundamentais em minha vida, e que não me  
permitiram desistir desta caminhada científica.*

# *Agradecimentos*

**Quero agradecer primeiramente à Deus**, por me permitir chegar até aqui e por fazer com que os meus planos coincidissem com os Dele. Tudo Dele, por Ele e para Ele.

**Agradeço aos meus pais Lúcia Helena e José Luiz** por todo apoio e suporte, pelo carinho, pelos sábios conselhos e por estarem ao meu lado, independente das escolhas que fiz, vocês são o meu coração batendo fora do meu peito.

**Ao meu companheiro Victor Munhoz Ruiz**, que apesar de todos os desafios ficou ao meu lado, e que de longe é a pessoa que mais me dá forças para superar minhas dificuldades, munido de uma calma invejável. Você tem, sem dúvidas, o melhor coração que já conheci. Te amo absurdamente.

**Agradeço à minha irmã Thais**, pelas risadas e momentos de descontração e por conversas estimuladoras, amo você!

**Aos meus amigos e familiares** por todo apoio, amor e momentos de descontração, reforçando à mim mesma que para um trabalho bem feito são necessárias pausas divertidas.

**À minha orientadora Simone Baldini Lucheis**, por todo conhecimento, paciência, conversas construtivas, orientação e apoio. Obrigada de coração por ter me aceitado em seu laboratório e ter me acolhido como pesquisadora e aluna. Por me desafiar a ser melhor, a correr atrás dos sonhos, a aceitar desafios, a praticar responsabilidade. Obrigada por ajudar a me moldar como docente e pesquisadora.

**Aos caros colegas de laboratório: Suzane Manzini, Isabella Neves, Wesley José, Livia Guiraldi, Maria Izabel Merino de Medeiros**, por fazer a caminhada científica ser tão prazerosa e respeitosa ao lado de vocês. São um verdadeiro presente e exemplo de trabalho em equipe. A relação que temos como amigos e colaboradores não se encontra facilmente pelos laboratórios da ciência brasileira, por vezes tão competitivo e arrogante. Sou grata por sermos assim, espero que a nossa relação se perpetue ao longo dos anos. Admiro cada um de vocês.

**À Virgínia Bodelão e mais uma vez à Maria Izabel Merino de Medeiros,** pela oportunidade, acolhimento e todo conhecimento passado. Por me permitirem dispor de técnicas e equipamentos necessários ao meu projeto, tanto no Instituto Adolfo Lutz (IAL), quanto na Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA/Bauru).

**À Aghata Alves,** pelos conhecimentos em PCR em tempo real, pela ajuda no projeto e por ser uma pessoa extremamente agradável e engraçada. É nítido o seu talento e a sua inteligência, e o fato de conseguir agregar isso à sua personalidade bondosa e divertida me faz te admirar. Torço pelo seu sucesso sempre!

**Ao Matheus de Souza Ribeiro Mioni,** por suas preciosas contribuições científicas em relação à *Coxiella burnetii* e às técnicas moleculares que me assombravam. Obrigada pelo conhecimento. **À Ana Paula Flamínio,** por seu conhecimento técnico-científico que foram extremamente importantes para o desenvolvimento da qPCR por sonda e Sybr. Sem dúvida esse trabalho não teria sido possível sem você. **Ao Prof. José Eduardo Corrente** por todo auxílio com a estatística do trabalho e por ser sempre tão simpático e solícito! **À Tallita Ribeiro** pelo auxílio com georreferenciamento e mapas, obrigada de coração!

**Aos demais colaboradores da UNESP,** tanto da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) e da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) que me auxiliaram neste trabalho. Professores, bibliotecários, técnicos dos laboratórios, secretários da seção de pós graduação e comitê de ética, enfim, qualquer um que tenha contribuído direta ou indiretamente neste trabalho.

**Às agências de fomento,** Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio à pesquisa do projeto de *Coxiella burnetii* (2020/09409-2) e a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida nos primeiros dois anos de projeto.

“E assim, depois de muito esperar, num dia como outro qualquer, decidi triunfar...

Decidi não esperar as oportunidades e sim, eu mesmo buscá-las.

Decidi ver cada problema como uma oportunidade de encontrar uma solução.

Decidi ver cada deserto como uma possibilidade de encontrar um oásis.

Decidi ver cada noite como um mistério a resolver.

Decidi ver cada dia como uma nova oportunidade de ser feliz.

Naquele dia descobri que meu único rival não era mais que minhas próprias

limitações e que enfrentá-las era a única e melhor forma de as superar.

Naquele dia, descobri que eu não era o melhor e que talvez eu nunca tivesse sido.

Deixei de me importar com quem ganha ou perde.

Agora me importa simplesmente saber melhor o que fazer.

Aprendi que o difícil não é chegar lá em cima, e sim deixar de subir.

Aprendi que o melhor triunfo é poder chamar alguém de ‘amigo’.

Descobri que o amor é mais que um simples estado de enamoramento, ‘o amor é

uma filosofia de vida’.

Naquele dia, deixei de ser um reflexo dos meus escassos triunfos passados e

passei a ser uma tênue luz no presente.

Aprendi que de nada serve ser luz se não iluminar o caminho dos demais.

Naquele dia, decidi trocar tantas coisas...

Naquele dia, aprendi que os sonhos existem para tornarem-se realidade.

E desde aquele dia já não durmo para descansar... simplesmente durmo para

sonhar.”

(Walt Disney)

## Resumo

*Coxiella burnetii* (*C. burnetii*) é uma bactéria gram-negativa causadora de uma zoonose cosmopolita denominada febre Q. Infecta diferentes animais, sendo os grandes ruminantes (bovinos) o maior reservatório. É conhecida por causar distúrbios gestacionais, tais como abortamentos, natimortos e partos prematuros, além de ocasionar infertilidade, gerando grande prejuízo econômico. A infecção em humanos ocorre pela inalação de aerossóis provindos dos excrementos, leite ou contato com produtos do parto destes animais. O objetivo deste estudo foi investigar *C. burnetii* em 102 amostras de leite bovino, a partir do leite de tanques de expansão de pequenas propriedades de agricultura familiar, situadas em oito municípios, abrangendo a região Centro-Oeste Paulista. Para isso, utilizou-se as técnicas moleculares de Reação em Cadeia da Polimerase convencional (PCR), Nested-PCR e PCR em tempo real (qPCR) e, em seguida, realizou-se o sequenciamento genético. Posteriormente, foi realizada a análise geográfica de distribuição de casos positivos diagnosticados nas regiões estudadas. Detectou-se *C. burnetii* em dezesseis amostras (15,68%) por Nested-PCR, vinte e duas (21,57%) pela qPCR/Sybr e trinta e duas (31,37%) pela qPCR/Sonda. A concordância entre os métodos demonstrou-se mediana. Houve detecção em sete dos oito municípios testados (87,50%). O genótipo identificado foi ST61. A identificação de *C. burnetii* indica possíveis riscos de infecção e impactos negativos na pecuária, de maneira silenciosa, visto que não há testagem sistemática na rotina de diagnóstico da qualidade do leite, levando à sub-notificação.

**Palavras-chave:** febre Q, bovinos, leite de vaca, diagnóstico molecular, georreferenciamento.

## Abstract

*Coxiella burnetii* (*C. burnetii*) is a gram-negative bacterium that causes a cosmopolitan zoonosis called Q fever. It infects a range of animals, but large ruminants (cattle) being the largest reservoir. It is known for causing gestational disorders in animals such as miscarriage, stillbirths and premature births, and infertility, generating a large negative economic impact. Infection in humans occurs through inhalation of aerosols containing the bacteria, coming from the excrement, milk or birth products of these animals. Therefore, the objective of this work was to research *C. burnetii* in 102 samples of milk from lactating cows, from milk from bulk tanks of small family farming properties. Different municipalities in the Central-West region of São Paulo were tested. The molecular techniques of conventional Polymerase Chain Reaction (PCR), Nested PCR and real-time PCR (qPCR- Sybr and Probe) were used and then genetic sequencing was carried out. Subsequently, a geographic analysis of the distribution of positive cases diagnosed in the different regions studied was carried out. *C. burnetii* was detected in sixteen samples (15.68%) by Nested-PCR, twenty-two (21.57%) by qPCR/Sybr and thirty-two (31.37%) by qPCR/Probe, the agreement between the methods proved to be reasonable. There was detection in seven of the eight cities tested (87.50%). The genotype identified was ST61. There is evidence of possible outbreaks and negative impacts on livestock that the presence of *C. burnetii* can cause silently, as notification and testing of the bacteria is not carried out, resulting in underreporting.

**Keywords:** q fever, cattle, cow's milk, molecular diagnosis, georeferencing.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- $\mu\text{L}$  – Microlitro
- $\mu\text{m}$  – Micrômetro
- APTA – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
- ATCC - American Type Culture Collection
- BLASTn - Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool
- CA - Califórnia
- Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CDC – Center for Disease Control and Prevention/ Centro de Controle e Prevenção de Doenças
- CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
- COVID – Corona Virus Disease/ Doença do Corona Vírus
- cPCR/PCR - Reação em Cadeia da Polimerase convencional
- CT - Cycle Threshold/Limiar do Ciclo
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
- EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid
- ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay/ Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- FAO - The Food and Agriculture Organization of the United Nations/ Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
- FMB – Faculdade de Medicina de Botucatu

- FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
- G – Grama
- GE – Empresa General Eletric
- HCl – Ácido Clorídrico
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia Estatística
- IBTEC – Instituto de Biotecnologia de Botucatu (UNESP)
- LASAB - Laboratório de Sanidade Animal de Bauru
- M – Mol
- Mg – Miligrama
- MgCl – Cloreto de Magnésio
- Min - Minuto
- mL – Mililitro
- Mm – Milímetro
- mM – Mili molar
- MST - Multispacer sequence typing
- nG – Nano gramas
- nM - Nano mols
- oC - Grau Celsius
- Pb – Pare de base
- pH - Potencial Hidrogeniônico
- PRONAF - Programa Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar
- qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
- RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta
- RPM – Rotação por Minuto
- s – Segundo

- SAA – Secretaria de Agricultura e Abastecimento
- SIF – Selo de Inspeção Federal
- SIGs – Sistemas de Informação Geográfica
- SP – São Paulo
- Taq - *Thermus aquaticus*/ Enzima
- TBE - Tris-borato-EDTA
- Tm - Temperatura de melting/dissociação
- Tris – Tris (hidroximetil) aminometano
- U - Unidades
- UK – United Kingdom/ Reino Unido
- UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
- USA - United States of América
- UV – Ultravioleta
- V – Volts
- vs - versus

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1 - Ciclo de vida de <i>Coxiella burnetii</i> .....                                                                                                                                                                                                                                 | 25  |
| Figura 2 - Localização dos municípios de coletas e número de amostras de leite de tanque coletadas de cada município.....                                                                                                                                                                  | 43  |
| Figura 3 - Esquema do procedimento de coleta das amostras de leite bovino e análises moleculares de PCR e qPCR para <i>Coxiella burnetii</i> . ....                                                                                                                                        | 44  |
| Figura 4 - Procedimento de extração de DNA a partir de leite bovino. Separação das amostras (A). Processamento das amostras de leite (B). Extração de DNA com kit específico (C). ....                                                                                                     | 45  |
| Figura 5 - Procedimento de Reação em Cadeia da Polimerase. Preparação do mix de PCR (A). Distribuição do mix de PCR (B). Adição do DNA extraído ao mix de PCR para posterior inserção em termociclador (C). ....                                                                           | 47  |
| Figura 6 - Procedimento de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR). Preparação do mix de PCR (A). Distribuição do mix de PCR (B). Aplicação de película específica para inserção no termociclador (C). Centrifugação da placa (D). Inserção da placa no termociclador (E)..... | 51  |
| Figura 7 - Procedimento de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) utilizando a sonda. Preparação do mix de qPCR (A). Amostras de DNA e mix preparado (B). Centrifugação das amostras de DNA (C). Termociclador Step-One utilizado (D).....                                    | 53  |
| Figura 8 - Suíno em trabalho de parto ao lado do tanque de refrigeração (A) e leitão bebendo restos de leite da saída do tanque de refrigeração no momento da coleta de leite (B).....                                                                                                     | 58  |
| Figura 9 – Amostras de leite de tanque positivas para <i>Coxiella burnetii</i> . Gel de agarose a 2%. Primers Trans1/Trans2 e N3+/N4- (PCR nested).....                                                                                                                                    | 59  |
| Figura 10 – Gráfico de amplificação de amostras positivas para qPCR/ Sybr .....                                                                                                                                                                                                            | 64  |
| Figura 11 - Exemplo de gráfico de amplificação de amostras positivas para qPCR/ Sonda. ....                                                                                                                                                                                                | 66  |
| Figura 12 - Detecção de <i>C. burnetii</i> ao analisar as técnicas em conjunto e separadamente.....                                                                                                                                                                                        | 68  |
| Figura 13 – Municípios incluídos no estudo e resultados positivos de acordo com as duas técnicas utilizadas.....                                                                                                                                                                           | 710 |
| Figura 14 - Cidades incluídas no estudo e número de amostras positivas.....                                                                                                                                                                                                                | 71  |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                                               | 18 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA .....                                                                                                    | 23 |
| 2.1. Visão geral e histórico.....                                                                                                 | 23 |
| 2.2. Mecanismos de transmissão e reservatórios .....                                                                              | 24 |
| 2.3. Relatos de coxielose/Febre Q no mundo .....                                                                                  | 29 |
| 2.4. <i>Coxiella burnetii</i> no Brasil.....                                                                                      | 32 |
| 2.5. <i>Coxiella burnetii</i> em leite bovino e produtos lácteos.....                                                             | 34 |
| 2.6. Sinais clínicos.....                                                                                                         | 35 |
| 2.7. Diagnóstico sorológico .....                                                                                                 | 36 |
| 2.8. Diagnóstico molecular .....                                                                                                  | 37 |
| 2.9. Georreferenciamento .....                                                                                                    | 38 |
| 3. OBJETIVOS .....                                                                                                                | 40 |
| 3.1. Objetivo geral .....                                                                                                         | 40 |
| 3.2. Objetivos específicos.....                                                                                                   | 40 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                       | 42 |
| 4.1. Comitê de Ética.....                                                                                                         | 42 |
| 4.2. Características dos municípios e propriedades rurais e coleta das amostras de leite bovino dos tanques de refrigeração ..... | 42 |
| 4.3. Local de realização dos exames.....                                                                                          | 45 |
| 4.4. Exames moleculares .....                                                                                                     | 45 |
| 4.4.1. Extração de DNA – leite.....                                                                                               | 45 |
| 4.4.2. Quantificação do DNA .....                                                                                                 | 46 |
| 4.4.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com iniciadores para a região específica IS1111 .....                                 | 46 |
| 4.4.4. Reação de Nested-PCR para a região IS1111 de <i>C. burnetii</i> .....                                                      | 48 |
| 4.4.5. Aquisição de cepas e controles .....                                                                                       | 49 |
| 4.4.6. Eletroforese em gel de agarose.....                                                                                        | 49 |
| 4.4.7. Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) utilizando o Sybr Go Taq .....                                         | 49 |
| 4.4.8. Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) utilizando a sonda Taqman .....                                        | 51 |
| 4.5. Sequenciamento .....                                                                                                         | 53 |
| 4.6. Genotipagem.....                                                                                                             | 54 |
| 4.7. Georreferenciamento .....                                                                                                    | 54 |
| 4.8. Análise Estatística.....                                                                                                     | 55 |
| 5. RESULTADOS .....                                                                                                               | 57 |
| 5.1. Coleta do leite e análise das propriedades.....                                                                              | 57 |
| 5.2. Quantificação do DNA a partir da extração do leite .....                                                                     | 59 |
| 5.3. Análise molecular .....                                                                                                      | 59 |

|        |                                                                                                            |    |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.3.1. | Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (PCR convencional).....                                        | 59 |
| 5.3.2. | Sequenciamento genético .....                                                                              | 60 |
| 5.3.3. | Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) utilizando Sybr63                                      |    |
| 5.3.4. | Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) utilizando a sonda                                     | 65 |
| 5.3.5. | Comparação das amostras positivas por técnica e município e análise de concordância entre os métodos ..... | 66 |
| 5.4.   | Genotipagem.....                                                                                           | 68 |
| 5.5.   | Análise espacial.....                                                                                      | 69 |
| 6.     | DISCUSSÃO .....                                                                                            | 74 |
| 7.     | CONCLUSÃO .....                                                                                            | 84 |
|        | REFERÊNCIAS .....                                                                                          | 85 |

# *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

*Coxiella burnetii* (*C. burnetii*) é uma proteobactéria gram-negativa intracelular obrigatória. Possui a estrutura de cocobacilo e pertence à ordem Legionellales. É amplamente conhecida por causar uma doença zoonótica cosmopolita, a coxielose; também chamada de febre Q, quando identificada em humanos. Tal bactéria é conhecida por infectar alguns grupos de animais como caprinos, ovinos e bovinos (CDC, 2019).

*C. burnetii* é encontrada principalmente em produtos do nascimento desses animais como, por exemplo, placenta e líquido amniótico. Além disso, produtos de abortamentos, urina, fezes e leite já foram relatados como responsáveis pela manutenção e transmissão da bactéria. Os humanos podem infectar-se com *C. burnetii* a partir da inalação de aerossóis contaminados. Os sinais mais comumente relatados são semelhantes à gripe, como febre, tremores, fadiga e dores musculares, e podem evoluir para um quadro sintomático grave e potencialmente fatal (Damasceno; Guerra, 2018).

Além das consequências relatadas em humanos, a doença apresenta um grande impacto na produtividade pecuária, uma vez que causa distúrbios de gestação como infertilidade, abortamentos, natimortos e prematuros (Deka *et al.*, 2018).

Por possuir o maior rebanho comercial do mundo, o Brasil se enquadra no maior exportador de carne bovina, no segundo maior produtor de carne e no sexto maior produtor de leite no mundo (Instituto Brasileiro de Geografia Estatística, 2019). Tais colocações demonstram que o país possui um número expressivo de animais, refletindo a importância da atividade pecuária no Brasil.

No contexto brasileiro, a presença de *C. burnetti* representa grande

perda econômica tanto animal quanto de mão de obra humana do ponto de vista ocupacional (trabalhadores rurais, agricultores, veterinários etc.). Por ter uma grande magnitude de rebanhos, o Brasil também possui uma alta quantidade de trabalhadores em risco ocupacional, que diariamente encontram-se em contato direto com os animais, secreções, aerossóis e excrementos, além do possível contato com carrapatos.

Além disso, grande parte da produção de leite do nosso país (cerca de 4.367.902 propriedades) é realizada em pequenas propriedades rurais, de caráter familiar. Essas propriedades são caracterizadas por agricultura de subsistência com pequena produção e muitas vezes, pobreza rural. Ainda assim, são responsáveis por quase 85% dos estabelecimentos agropecuários brasileiros, correspondem a 38% do Valor Bruto Agropecuário e 10% do Produto Interno Bruto (Barcellos *et al.*, 2019).

O leite nessas propriedades muitas vezes surge como alternativa econômica, e, por isso, é armazenado em tanques de refrigeração. Porém, tal produto não passa por processos de pasteurização ou de inspeção oficial para verificação de contaminantes. Por se enquadrarem como pequeno porte de caráter familiar, muitas vezes o produto é utilizado para consumo próprio ou comercializado para a população local (rural e urbana) sem fervura, mais conhecido como leite “cru”. Os pequenos produtores ainda utilizam esse leite para produção de derivados como manteiga e queijo, todos sem pasteurização (Barcellos *et al.*, 2019).

A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2017) citou que aproximadamente 30 milhões de toneladas de leite são desperdiçados devido à contaminação de agentes infecciosos causadores de

zoonoses. Esse desperdício contribui para a desnutrição e diminuição da resistência às doenças em idosos e crianças e causam embargos comerciais uma vez que há queda da produtividade e investimentos (Seimenis, 2008). Logo, a pesquisa de *C. burnetii* nas amostras de leite avalia a qualidade deste produto nos tanques de refrigeração, além de contribuir para prevenir os casos de zoonoses.

Não há dados específicos de casos confirmados de coxielose ou Febre Q no Brasil, já que de acordo com a Portaria nº 264, de 17 de fevereiro de 2020 do Ministério da Saúde esta zoonose não é uma doença de notificação compulsória em humanos (BRASIL, 2020). Portanto, diante da comprovação molecular de casos existentes no Brasil, torna-se necessária a adoção de medidas como alertar as autoridades sanitárias sobre a necessidade de um diagnóstico rápido e seguro, orientar profissionais que se enquadram nos grupos de risco e elaborar planos para o controle da disseminação da doença.

De acordo com Meurer *et al.* (2022 a), a inclusão da febre Q como uma doença de notificação compulsória em humanos no Brasil constitui-se em uma ação importante para que esta zoonose deixe de ser subnotificada. Entretanto, mesmo que haja notificação compulsória desta enfermidade, não necessariamente a febre Q deixaria de ser negligenciada, em semelhança ao que ocorre com outras doenças, como leishmaniose visceral e doença de Chagas.

Durante as investigações de processos febris agudos em humanos, bem como casos de endocardite com hemocultura negativa, a febre Q deve ser levada em consideração como diagnóstico diferencial, aliada à uma anamnese de qualidade para investigar possíveis fatores de risco para a doença, evitando-

se assim gastos desnecessários de recursos públicos. Portanto, estudos epidemiológicos são necessários, como a soroprevalência para a febre Q em humanos, assim como a resposta sorológica em animais.

De acordo com a instrução normativa nº 50 de 24 de setembro de 2013, a coxielose se enquadra como doença que requer notificação imediata de qualquer caso confirmado (BRASIL, 2013) em animais. Sendo assim, o monitoramento diagnóstico de identificação do patógeno e a análise espacial de propriedades são importantes para vigilância epidemiológica, além da investigação de sinais clínicos nos animais positivos, principalmente abortamentos ou distúrbios reprodutivos.

Portanto, faz-se necessário o melhor entendimento da circulação da doença, possibilitando melhor compreensão da epidemiologia da infecção que possam subsidiar políticas públicas em educação em saúde e medidas de prevenção para diminuir as chances de infecções em humanos.

# *Revisão de Literatura*

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Visão geral e histórico

Conhecida por ser uma proteobactéria intracelular obrigatória, *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*) é amplamente conhecida por causar uma doença zoonótica cosmopolita: a febre Q, também chamada de coxielose nos animais (Fournier *et al.*, 1998). Primeiramente foi descrita na Austrália em 1935 por Edward Holbrook Derrick, durante a pesquisa de uma doença desconhecida em um grupo de trabalhadores de um matadouro. Por não saber do que se tratava, denominou-a como ‘*Query Fever*’ (que pode ser traduzido como “dúvida” e de onde se origina o termo “Febre Q”).

Em seguida, em 1937, os pesquisadores Frank Burnet e Mavis Freeman classificaram a bactéria causadora da febre como pertencente ao gênero *Rickettsia*, nominando-a como *Rickettsia burnetii* (Santos *et al.*, 2007; Oyston; Davies, 2011).

Concomitantemente, Herald Cox e seu grupo de pesquisa em Montana, nos Estados Unidos, também desenvolviam um estudo com um microrganismo desconhecido (chamado de agente *Nine Mile*), que posteriormente percebeu-se ser a mesma bactéria. Em 1948, a bactéria foi descrita como pertencente ao gênero *Coxiella*, baseado em estudos moleculares e, para homenagear os dois grupos de pesquisadores, recebeu o nome vigente até os dias de hoje: *Coxiella burnetii* (Santos *et al.*, 2007; Oyston; Davies, 2011).

Apesar de representar uma importante zoonose, esta febre é pouco relatada e diagnosticada mesmo com uma abrangência mundial. Seu baixo diagnóstico se dá ao fato de que *C. burnetii* causa sintomas inespecíficos

parecidos com a gripe (Influenza), fazendo com que os dados de prevalência sejam subestimados (El-Mahallawi *et al.*, 2015). Ainda assim, a febre Q foi listada como uma entre as treze zoonoses mais importantes em âmbito global, com impacto à saúde humana, à pecuária e chamando atenção em virtude da gravidade da doença (Grace *et al.*, 2012).

## **2.2. Mecanismos de transmissão e reservatórios**

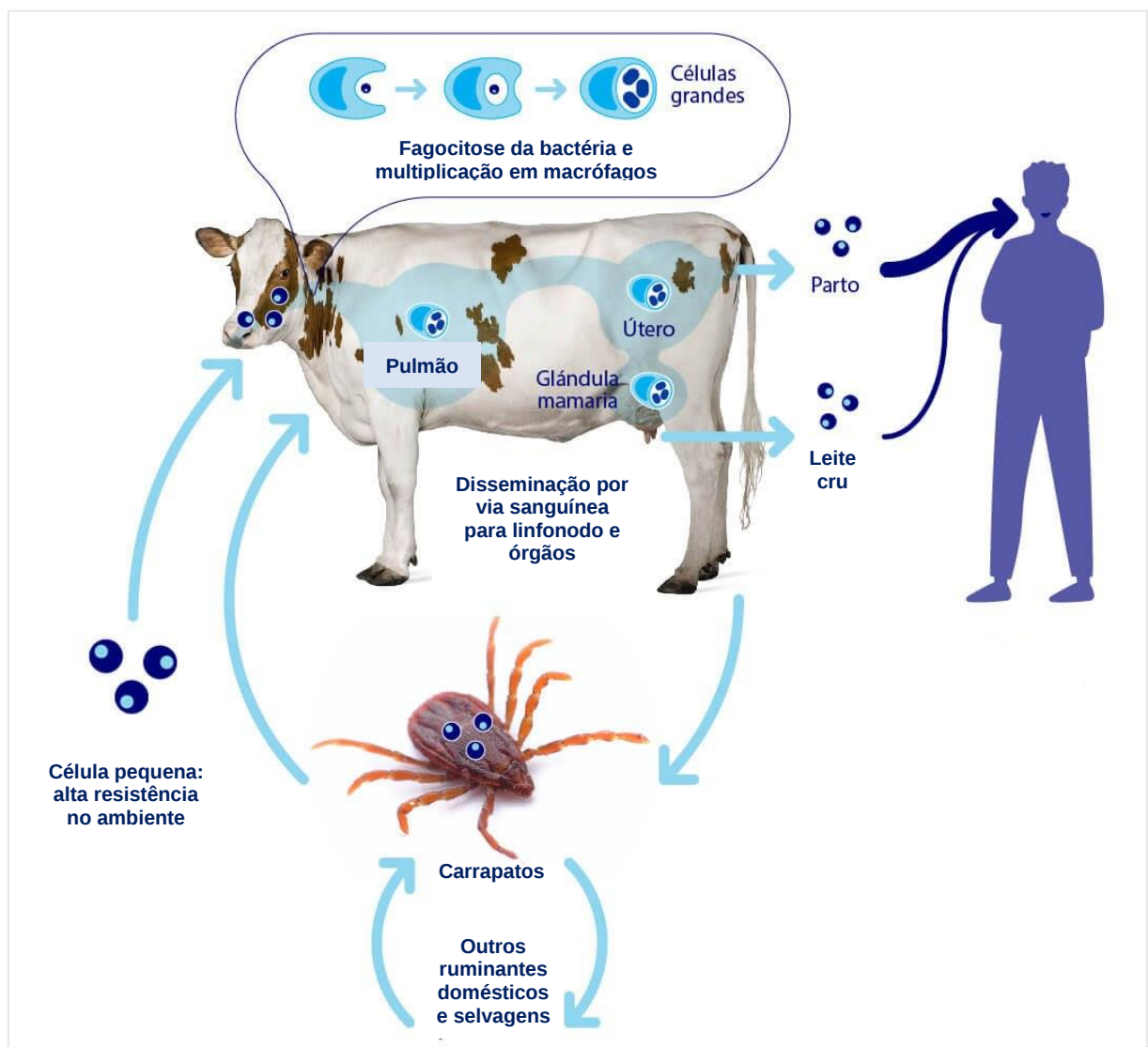
Ao infectar o organismo humano, a bactéria invade principalmente os fagócitos mononucleares, como os macrófagos alveolares, para causar a doença (Dragan; Voth, 2020). É possível observar duas formas evolutivas do microrganismo, ou seja, *C. burnetii* possui um ciclo de desenvolvimento bifásico. A primeira forma se trata da reprodução exponencial da bactéria, denominada Variante de Células Grandes (LCV), enquanto que a segunda fase é caracterizada pela forma estacionária não-replicativa de *C. burnetii*, denominada Variante de Células Pequenas (SCV) (Shaw; Voth, 2019).

Estas últimas são mais estáveis no ambiente, possuindo alta resistência à dessecação, estresses mecânicos, térmicos, químicos e osmóticos. Foi relatada sua resistência em lã (sete à dez meses), carne fresca (um mês) e leite (mais de 40 meses), razões que auxiliaram a adoção de altas temperaturas para pasteurização na década de 1950 (Angelakis; Raoult, 2010). O ciclo de vida de *C. burnetii* encontra-se resumido na Figura 1.

Como fator de virulência, a bactéria expressa o lipopolissacarideo (LPS). O microrganismo apresenta duas variações do LPS de membrana, conhecidos como LPS I (fase virulenta I) e LPS II (fase avirulenta II). Podemos destacar o LPS I, que possui fenótipo liso, constituído de dois açúcares:

dihidrohidroxistreptose e virenose, que até então não foram encontrados em LPSs de outras bactérias, considerados, portanto, biomarcadores únicos de *C. burnetii*. Estes biomarcadores possuem, inclusive, envolvimento na imunobiologia da febre Q (Shaw; Voth, 2019).

Figura 1 - Ciclo de vida de *Coxiella burnetii*



Fonte: Ceva, 2022 (adaptado)

*C. burnetii* é extremamente infecciosa; pois uma pequena quantidade em contato com o organismo já pode causar infecção por via respiratória (1 a 10

células são suficientes para a doença ser desencadeada). É infectante no ambiente por até quatro meses e apresenta resistência à seca, fatores físicos como o calor (resistência a 30 minutos sob uma temperatura de 60°C) e químicos (como a radiação ultravioleta e etanol 50%). Ainda, pode resistir à solução de hipoclorito de sódio 100 mg/mL e às variações de pH (Madariaga *et al.*, 2003; Kazar, 2005; Santos *et al.*, 2007; CDC, 2019). Além disso, um risco maior de adquirir infecção foi relatado em locais de clima quente ou nos meses de verão (Dragan; Voth, 2020).

Devido a alta virulência, resistência ambiental e grande capacidade de produzir aerossóis, em 2009 o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos classificaram *C. burnetii* como agente de ameaça biológica categoria B, uma vez que o microrganismo é capaz de causar significativa incapacidade ocupacional e impactos negativos a longo prazo se persistente na população (CDC, 2009).

O período de incubação varia entre 10 e 21 dias após a infecção e os primeiros sinais da doença ocorrem entre 10 e 90 dias (Rozental *et al.*, 2012). Diferentes espécies de animais são susceptíveis, como bovinos, caprinos, ovinos, animais domésticos (cães, gatos, coelhos) e selvagens, aves e artrópodes (principalmente carrapatos), bem como humanos (Sidi-Boumedine *et al.*, 2010; CDC, 2019).

Os principais reservatórios são bovinos, caprinos e ovinos (Angelakis; Raoult, 2010), sendo os bovinos as fontes mais importantes de infecção humana (Kazar, 2005). Um estudo conduzido por Guatteo *et al.* (2011) com *C. burnetii* em bovinos, caprinos e ovinos evidenciou que a prevalência da bactéria foi maior em bovinos em relação aos pequenos ruminantes.

Em produtos biológicos, como urina, leite, fezes, líquido vaginal e componentes de nascimento como placenta e líquido amniótico, *C. burnetii* resiste de maneira altamente eficaz. O animal infectado pode, inclusive, liberar a bactéria em líquidos biológicos durante meses. Além disso, a bactéria já foi descrita também em produtos de abate e lã. A transmissão para humanos ocorre pela inalação dos aerossóis presentes nos produtos supracitados (Esmaeili *et al.*, 2019a; Rozental *et al.*, 2020).

A partir da ampla variedade de amostras que podem ser contaminadas pela bactéria, e posteriormente veiculada por aerossóis, destacam-se os riscos ocupacionais de infecção por *C. burnetii*. Portanto, a infecção é essencialmente ocupacional e, na maioria dos casos, afeta pessoas que exercem atividades relacionadas à pecuária de corte e leite. Em humanos geralmente evolui de forma benigna, porém, em alguns casos, pode evoluir cronicamente, culminando com desfecho fatal (Damasceno; Guerra, 2018). É importante citar, entretanto, que não há somente risco ocupacional, visto que surtos de febre Q já atingiram pessoas residentes a longas distâncias do local inicial de contágio (Schimmer *et al.*, 2010)

A infecção pelo leite representa uma ameaça à saúde pública, já que o produto cru ainda é consumido por uma parcela da população, além de constituir-se como base para derivados, como o queijo artesanal e manteiga, servindo, portanto, como via de transmissão do patógeno (Selim *et al.*, 2019; Rozental *et al.*, 2020). Por esses motivos, e conforme citado anteriormente, trabalhadores rurais, fazendeiros, veterinários e funcionários de abatedouro são as profissões de alto risco de infecção para *C. burnetii*, destacando o caráter ocupacional da enfermidade (Cook, 2014).

Outra rota de infecção são as partículas de poeira e/ou gotículas infectadas, normalmente quando os excrementos dos animais secam no solo (Angelakis; Raoult, 2010; Roest *et al.*, 2011; Whelan *et al.*, 2012; CDC, 2019).

Além disso, a infecção também pode ser transmitida pela picada de carrapatos, prováveis vetores da bactéria, ainda que esta hipótese não esteja totalmente confirmada e a real capacidade de transmissão da infecção permaneça desconhecida (Kazar, 2005; Duron, 2015). No entanto, a bactéria já foi identificada em várias espécies de carrapatos, com destaque para *Rhipicephalus bursa* e *Hyalomma excavatum* (Eldin *et al.*, 2017; Aouadi *et al.*, 2017), com prevalências variáveis em vários gêneros. Até mesmo as fezes de carrapatos podem veicular o patógeno (Duron *et al.*, 2015).

Varella-Castro *et al.* (2018) alertaram para a porcentagem de carrapatos portadores de *C. burnetti*, especialmente os gêneros *Rhipicephalus* e *Haemaphysalis*. Abdelkadir *et al.* (2019) conduziram um estudo com carrapatos ingurgitados na Argélia, e encontraram a bactéria em dois *pools* de macerado dos artrópodes. A presença da bactéria, no entanto, não significa que os carrapatos representem vetores, porém, indica a circulação do microrganismo, elucidando a eco-epidemiologia da doença.

Durante o procedimento de tratamento de esgoto, particularmente na aeração ativa de iodo, há muita formação de aerossóis. Estes podem também conter o microrganismo patogênico, originário de águas residuais (BRANDI *et al.*, 2000). Um estudo conduzido por Schets *et al.* (2013) detectou pouca quantidade da bactéria em água de esgoto comparado à produtos animais, porém ainda assim demonstrou sua presença.

### 2.3. Relatos de coxielose/Febre Q no mundo

Vários surtos já foram reportados em humanos e animais no mundo, porém há um surto que merece destaque: ocorreu entre 2007 e 2010, envolvendo quase 4.000 pessoas na Holanda, em locais próximos às fazendas de leite caprino, devido exposição às cabras infectadas. Somente em 2009 foram detectados 2.361 casos, incluindo seis mortes, até então a maior epidemia já registrada na Europa (Delsing *et al.*, 2010; Schimmer *et al.*, 2012). Os animais dessas fazendas apresentaram histórico de abortamentos devido à zoonose e estudos posteriores demonstraram que pessoas até 2 km de distância estariam em risco de contrair a infecção (Schimmer *et al.*, 2010).

Muitos estudos identificaram a bactéria nas Américas. Somente nos Estados Unidos, *C. burnetii* já foi responsável por causar surto de Febre Q em 2008, com 132 casos positivos para febre (117 casos agudos e 15 crônicos) (Jager *et al.*, 2011). Anteriormente, em 2006, um estudo investigou 508 profissionais da área veterinária no Havaí, e resultou em sorologia positiva para *C. burnetii* em 133 (26,2%) da população estudada (Whitney *et al.*, 2009). Além disso, ainda no país, um estudo utilizando 1622 amostras ambientais detectou uma positividade de 23,8% (Kersh *et al.*, 2016). Um relato de caso descrito por Allan-Britz *et al.* (2018) de um paciente norte-americano com endocardite e meningite descreveu que o paciente tinha altos títulos sorológicos para *C. burnetii*, além de ter provado a presença da bactéria por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Interessantemente, a bactéria foi relatada também em diferentes espécies de leões marinhos, no Alasca (Minor *et al.*, 2013).

Estudos conduzidos no Canadá detectaram a bactéria em felinos residentes em fazendas de bovinos por qPCR e ELISA (Cyr *et al.*, 2021) e em

ovinos e caprinos, também pelo exame sorológico (Meadows *et al.*, 2015 a,b). No Equador, um estudo realizado em 386 rebanhos leiteiros e de corte detectou uma soroprevalência de 12,6% (Carbonero *et al.*, 2015), enquanto na Colômbia, a prevalência da bactéria por qPCR em amostras sanguíneas atingiu 25,9% e 19,5% em fazendeiros e rebanho bovino, respectivamente (Cabrera-Orrego *et al.*, 2020). Ainda se detectou *C. burnetii* em produtos de abortamentos no Uruguai (Rabaza *et al.*, 2021), em ovelhas prenhas em Barbados (Trujillo *et al.*, 2023) e em uma amostra humana na Argentina (Cicuttin *et al.*, 2015).

O Escudo das Guianas, região que abrange os países Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Colômbia e Brasil, é a região do mundo que mais relata casos de infecção por *Coxiella burnetii*, com destaque para a cepa MST17, considerada altamente virulenta (Epelboin *et al.*, 2021).

Na cidade de Magdalena, na Colômbia, um estudo foi conduzido a partir do sangue de pacientes com doença febril aguda e detectou 39,5% dos pacientes reagentes. Neste mesmo estudo, carrapatos do gênero *Rhipicephalus* foram coletados da residência rural dos pacientes, e 11,8% estavam infectados, evidenciando a manutenção da bactéria em artrópodes e seu potencial zoonótico (Cabrera *et al.*, 2022).

Na Europa, sorologia positiva para *C. burnetii* foi observada em pequenos roedores (Bártová *et al.*, 2020), pequenos e grandes ruminantes (Borodusky *et al.*, 2017; Magouras *et al.*, 2017; Szymańska-Czerwińska *et al.*, 2017; Dobos *et al.* 2022), além de testes moleculares em animais de produção (Szymańska-Czerwińska *et al.*, 2019; Dobos *et al.*, 2020; Basanisi *et al.*, 2022; Hemsley *et al.*, 2023), leite bovino (Borodusky *et al.*, 2017), em carrapatos, aves e animais selvagens (Cumbassá *et al.*, 2015; Knap *et al.*, 2019; Tokarevich *et al.*, 2019) e

produtos de abortamento (Chochlakis *et al.*, 2018).

Em relação ao continente africano, diferentes estudos relataram a presença da bactéria. Revisões sistemáticas e meta-análises reuniram resultados referentes à ocorrência de *C. burnetii* em animais selvagens, domésticos, carrapatos e em humanos (Yessinou *et al.*, 2022, Diseko *et al.*, 2023; Muhammad *et al.*, 2023). Animais como dromedários (Devaux *et al.*, 2020), camelos (Frangoulides *et al.*, 2021), bovinos (Selim *et al.*, 2023), caprinos (Magadu; Thompson, 2023), roedores e seus ectoparasitas (Kamani *et al.*, 2018) roedores e aves (Ramatla *et al.*, 2023) além de animais destinados a abatedouros (Mangena *et al.*, 2021) se mostraram infectados.

Um estudo em pacientes sintomáticos com quadro febril demonstrou a presença da bactéria (Angelakis *et al.*, 2014). Ainda na África, estudos demonstraram DNA e soroprevalência de *C. burnetii* em amostras cutâneas de humanos, bem como em partículas de poeira de área rurais e em comunidades pastoris (Diouf *et al.*, 2021; Muema *et al.*, 2022).

No continente asiático, vários países relataram *C. burnetii* em diferentes animais e produtos. A bactéria foi encontrada por testes moleculares em ouriços na China (Gong *et al.*, 2020), em humanos e ruminantes domésticos na Turquia (Ozgen *et al.*, 2022), em búfalos na Índia (Keshavamurthy *et al.*, 2019), em carrapatos de mamíferos domésticos e selvagens no Paquistão e no Irã (Rahravani *et al.*, 2022; Ali *et al.*, 2023) e em suínos (Seo *et al.*, 2016a). Além disso, produtos de abortamentos (Kilicoglu *et al.*, 2020) e amostras de leite de tanques de refrigeração provindos de diferentes animais (Seo *et al.*, 2018; Esmaeili *et al.*, 2019b) já foram relatados no continente.

Estudos que utilizaram a metodologia baseada em testes sorológicos

também foram desenvolvidos na Ásia. Ruminantes domésticos, carrapatos, humanos, equinos e suínos são exemplos de organismos testados sorologicamente para a bactéria, demonstrando presença de anticorpos anti-*C. burnetii* (Seo *et al.*, 2016b; Dabaja *et al.*, 2019; Lafi *et al.*, 2020; Bae *et al.*, 2021; Yadav *et al.*, 2022).

Na Oceania, estudos relataram a presença de *C. burnetii* em humanos (Parker *et al.*, 2010; Mathews *et al.*, 2020; Sellens *et al.*, 2020), cães (Shapiro *et al.*, 2016; Orr *et al.*, 2022), gatos (Shapiro *et al.*, 2015), marsupiais e carrapatos (Cooper *et al.*, 2013), cangurus e animais de produção (Banazis *et al.*, 2010; Bennett *et al.*, 2011) e cervos (Voss *et al.*, 2023).

Diante do exposto, observa-se que *C. burnetii* é uma bactéria de caráter cosmopolita, que atinge grande variedade de espécies, incluindo o ser humano, e pode estar presente em produtos abortivos, produtos lácteos e até mesmo no domicílio e peridomicílio onde encontram-se animais infectados.

#### **2.4. *Coxiella burnetii* no Brasil**

O primeiro relato no Brasil ocorreu em 1953 por Brandão e colaboradores. Posteriormente, Ribeiro-Netto *et al.* (1964) desenvolveram um estudo no Vale do Paraíba em São Paulo, envolvendo 200 ordenhadores e tratadores de bovinos, detectando 17 casos positivos. Quase uma década depois, mais estudos foram conduzidos por Riemann *et al.* (1975), envolvendo sorologia de humanos.

Depois de um lapso de três décadas, Costa *et al.* (2005 e 2006) desenvolveram também um estudo sorológico em humanos. Somente em 2011, Lemos *et al.* desenvolveram o primeiro estudo molecular para a doença no país, identificando a bactéria em um paciente de 47 anos, o qual havia relatado contato

prévio com cabras e produtos de abortamentos de animais. Mares-Guia *et al.* (2014) pesquisaram *C. burnetii* a partir de amostras de sangue de catorze cães e um gato; amostras de sangue, leite, *swab* anal e vaginal a partir de dez cabras; amostras de sangue a partir de três ovelhas e amostras de sangue a partir de dois cavalos, verificando que dois cães, duas ovelhas e cinco cabras foram reagentes e o DNA foi amplificado a partir de seis amostras de leite e duas amostras de sangue de cabras e cães, respectivamente.

Estudo posterior com pacientes com histórico de endocardite demonstrou prevalência de 4,8% de anticorpos anti-*C.burnetii* por Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Desses, 1,8% apresentavam endocardite similar à causada por *C. burnetii* (Siciliano *et al.*, 2015).

Até então, havia detecção da bactéria no país, porém os estudos eram limitados em quantidade. A partir de 2015, mais estudos com a bactéria ganharam destaque. A bactéria já foi identificada em roedores na Mata Atlântica (Rozental *et al.*, 2017), na região semi-árida do Brasil, em Pernambuco, em caprinos e ovinos (Souza *et al.*, 2018), em seres humanos com histórico de utilização de drogas injetáveis (Rozental *et al.*, 2018), em caprinos com desordens reprodutivas (Oliveira *et al.*, 2018), em morcegos na região da Floresta Amazônica (Ferreira *et al.*, 2018), e em ovinos, caprinos e bovinos pela técnica de *Multispacer Sequence Typing* (Mioni *et al.*, 2019a).

Estudos mais recentes detectaram a bactéria em animais de abatedouro (Mioni *et al.*, 2020), humanos com suspeita de Dengue (França *et al.*, 2022; Meurer *et al.*, 2022b), em fetos bovinos abortados (Mioni *et al.*, 2022) e em leite (Mioni *et al.* 2019b; Rozental *et al.* 2020; Nascimento *et al.*, 2021).

## **2.5. *Coxiella burnetii* em leite bovino e produtos lácteos**

Vários estudos mostram a presença de *C. burnetii* em leite de animais infectados, bem como em outros produtos lácteos derivados. Devido à sua presença no leite, pode-se considerar também a contaminação pela bactéria em tanques de refrigeração de leite não pasteurizado.

Um estudo conduzido em 238 amostras lácteas contendo leite cru, queijos, iogurtes, sorvetes e massa (*dough*) detectou *C. burnetii* em 20 amostras (8,4%), das quais treze amostras pertencentes ao leite cru, três em iogurtes, duas em queijo, e duas em massa (Abdali *et al.*, 2018).

Estudos tem identificado de maneira preocupante que a bactéria circula em tanques de refrigeração. Esses tanques contêm leite não pasteurizado, ao qual, na maioria das vezes, é repassado aos laticínios. Entretanto, podem também ser vendidos diretamente ao consumidor final, principalmente nos casos de pequenas propriedades rurais. Mohammad e colaboradores (2017) avaliaram 78 tanques de refrigeração contendo leite bovino, na Jordânia e testaram sorologicamente as amostras pela técnica de ELISA, observando 70,9% de animais sororreagentes para *C. burnetii* no leite.

Outro estudo desenvolvido por Bauer e colaboradores (2015) revelou 61,1% de presença de DNA de *C. burnetii* por técnicas moleculares com o marcador IS1111 em leite dos tanques. Os estudos com maior prevalência da bactéria, nos Estados Unidos, mostram 94 a 96% de positividade, utilizando técnicas sorológicas e moleculares como ELISA, PCR em tempo real, Nested PCR e sequenciamento genético (Kim *et al.*, 2005; Pearson *et al.*, 2014).

Estudo realizado no estado de São Paulo, Brasil, verificou quatro (3,57%) de 112 amostras de leite cru comercializado diretamente para consumo humano,

positivas para *C. burnetti*. Entretanto, a baixa prevalência não reduz a importância da presença da bactéria, uma vez que esse produto estava sendo vendido para consumo humano imediato e sem pasteurização, podendo causar doença nos consumidores (Mioni *et al.*, 2019). Outro estudo, no Rio de Janeiro, detectou a bactéria em 9,43% (5/53) de queijos artesanais, produto derivado do leite (Rozental *et al.*, 2020).

Uma revisão sistemática analisou vários estudos que utilizaram leite de tanques de refrigeração. Das 4031 amostras analisadas, 1661 foram positivas (41,2%). A revisão afirma que a porcentagem de positividade dos estudos variava de 10,7% a 76,9%, indicando diferença de prevalência da bactéria a depender da região analisada (Rabaza *et al.*, 2020).

Ainda que diversos estudos tenha provado a circulação da bactéria em produtos lácteos, no Brasil são escassos estudos com este tipo de produto, principalmente em tanques de resfriamento.

## **2.6. Sinais clínicos**

Embora a infecção geralmente não apresente sinais clínicos específicos, pode-se observar febre súbita, letargia, infertilidade, abortamentos tardios e partos de natimortos em animais (Arricau-Bouvery; Rodolakis, 2005; Porter *et al.*, 2011). Devido à essas complicações, *C. burnetii* é considerada uma bactéria de grande impacto econômico, já que diminui a produtividade dos animais (Deka *et al.*, 2018).

Apesar de 60% dos casos serem assintomáticos, em humanos podem ocorrer sinais como pneumonia atípica, hepatite granulomatosa, e meningoencefalite (Tissot-Dupont *et al.*, 2008; Angelakis; Raoult, 2010). Assim

como nos animais de produção, a infecção também pode causar consequências na saúde de gestantes, trazendo resultados adversos à gravidez, como o abortamentos espontâneos, natimortos, partos prematuros e baixo peso ao nascer (Goldenberg *et al.*, 2010; Baud; Greub, 2011).

Ainda em humanos, se têm observado ocasionalmente infecção crônica meses ou anos após a fase aguda, na qual a endocardite o sinal mais frequente (Delsing *et al.*, 2010; Astobiza *et al.*, 2011). Estudos feitos com pacientes curados da infecção relataram severa fadiga mesmo após um ano do início dos sinais clínicos, conhecida como Síndrome de fadiga pós febre Q (Limonard *et al.*, 2010).

## **2.7. Diagnóstico sorológico**

A sorologia é comumente usada para detectar *C. burnetii* em animais (Caraguel *et al.*, 2020). A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2018) recomenda a sorologia pelo seu bom indicador de prevalência de *C. burnetii*. Contudo, é importante mencionar que a detecção sorológica individual (ou seja, para cada animal) possui desvantagens, uma vez que uma grande proporção de animais que liberam *C. burnetii* e produtos abortivos são soronegativos. Portanto, o ideal é realizar um teste massivo de leite proveniente de tanques a granel ou testes agrupados de amostras de animais.

A OIE afirma ainda que os testes de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e de Imunofluorescência Indireta são os mais indicados para o diagnóstico de *C. burnetii*, pois são os melhores em sensibilidade e especificidade. A RIFI é considerada referência para ensaio sorológico pela facilidade de execução e maior confiabilidade dos resultados em humanos enquanto que o ELISA é padrão-ouro para diagnóstico nos animais (Mares-Guia, 2015).

## 2.8. Diagnóstico molecular

Vários métodos diagnósticos são empregados para detectar *C. burnetii*, principalmente aqueles baseados na detecção de DNA por PCR (PCR convencional, Nested PCR, real-time PCR (qPCR) (Klee *et al.*, 2006; Chen; Ching, 2014).

*C. burnetii* revelou possuir 20 cópias da transposase IS1111 em seu genoma ao analisar a cepa *Nine Mile*. Esta é a região conservada da bactéria, considerada um bom alvo para os iniciadores das reações de amplificação. Deste modo, detectar e diferenciar *C. burnetii* por Nested PCR se mostrou útil. Um estudo utilizando a técnica de Nested PCR e os *primers trans* (específicos para a região conservada IS1111 da bactéria) provou que adicionar esta técnica após a primeira PCR levou à resultados melhores que somente utilizar a PCR convencional (Denison *et al.*, 2007).

Outra vantagem da técnica de Nested PCR é poder utilizá-la para vários tipos de amostras como o sangue, leite, *swabs* e tecidos (KIM *et al.*, 2005). Além disso, a sensibilidade do teste é melhor que a PCR convencional, e utilizando o *primer trans*, bactérias *Coxiella-like* não podem intervir no resultado molecular (Duron *et al.* 2015).

A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) é uma técnica fundamental nos que revolucionou a detecção de RNA e DNA, com o objetivo de minimizar as numerosas limitações da PCR convencional. Caracteriza-se por um método de quantificação e amplificação simultânea do DNA, baseada na detecção e quantificação de um composto fluorescente durante as primeiras fases da PCR. Apresenta inúmeras vantagens como realizar análise rápida e simples, sem influência da amplificação não específica, podendo a amplificação

ser controlada em tempo real. Além disso, o risco de contaminação é baixo devido à ausência de processamento pós-PCR dos produtos resultantes. Por fim, requer pouca quantidade de material, caracterizando-se como uma técnica mais específica, sensível e reprodutível (Olivera, 2010).

## **2.9. Georreferenciamento**

Os Sistemas de Informação Geográfica (SIGs) são ferramentas de georreferenciamento que possibilitaram integrar dados ambientais e dados de saúde. Assim sendo, a realização de técnicas de distribuição espacial dos dados possibilita uma caracterização mais sofisticada de riscos e seus fatores determinantes (Arjona, 2017).

Para que seja possível compreender o perfil epidemiológico das zoonoses na saúde pública, como é o caso da Febre Q, o uso de técnicas de análise espacial e geográfica é fundamental. Com essas ferramentas, é possível investigar relações entre a presença da bactéria e seu ambiente de origem, analisar variáveis que possam explicar fatores de risco e compreender a dinâmica de distribuição das doenças (Magalhães, 2012).

Portanto, diante da comprovação molecular de *C. burnetii* em animais e produtos de consumo no Brasil, torna-se necessária a adoção de medidas, como alertar as autoridades sanitárias sobre ferramentas para um diagnóstico rápido e seguro, orientar profissionais que se enquadram nos grupos de risco e elaborar planos para o controle da disseminação da doença. Sendo assim, pretende-se com este estudo detectar a presença de *Coxiella burnetii* em amostras de leite de tanque em pequenas propriedades de agricultura familiar, para compreender melhor a epidemiologia da infecção.

*Objetivos*

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Pesquisar *C. burnetii*, pelo diagnóstico molecular e análise espacial, em leite bovino de tanques de refrigeração, procedentes de pequenas propriedades rurais abrangendo a região Centro-Oeste do Estado de São Paulo.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Detectar *C. burnetii* em amostras de leite bovino pelo uso de técnicas moleculares de PCR e Nested-PCR e PCR em tempo real (utilizando os sistemas de agentes intercalantes de DNA (Sybr) e sonda de hidrólise)

- Realizar o sequenciamento genético a partir dos resultados de PCR Nested a fim de confirmar a presença do agente e comparar a similaridade da bactéria com as sequências depositadas no GenBank;

- Comparar a concordância entre os métodos moleculares utilizados para detectar *Coxiella burnetii* no leite do tanque;

- Genotipar a amostra de melhor material genético a fim de identificar o genótipo circulante na região do Centro-Oeste paulista;

- Utilizar georreferenciamento para mapear a distribuição de *C. burnetii* por município, a fim de compreender e delimitar as possíveis áreas de risco de infecção.

# *Material e Métodos*

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Comitê de Ética**

O presente projeto de pesquisa contou com a utilização de material biológico (leite de tanque de refrigeração) de outro projeto de pesquisa, já concluído e publicado, o qual foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética-CEUA da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ – UNESP sob número 51/2016. O aproveitamento do material de pesquisa é justificado pelas restrições sanitárias impostas pela pandemia por COVID-19 no início do estudo. A coleta de materiais dentro das propriedades rurais foi impossibilitada, para preservar a saúde dos produtores e funcionários, seguindo as medidas de isolamento. O atual projeto de pesquisa de doutorado foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética – CEUA da Faculdade de Medicina de Botucatu - FMB–UNESP sob número 1369/2020 (Anexo A).

### **4.2. Características dos municípios e propriedades rurais e coleta das amostras de leite bovino dos tanques de refrigeração**

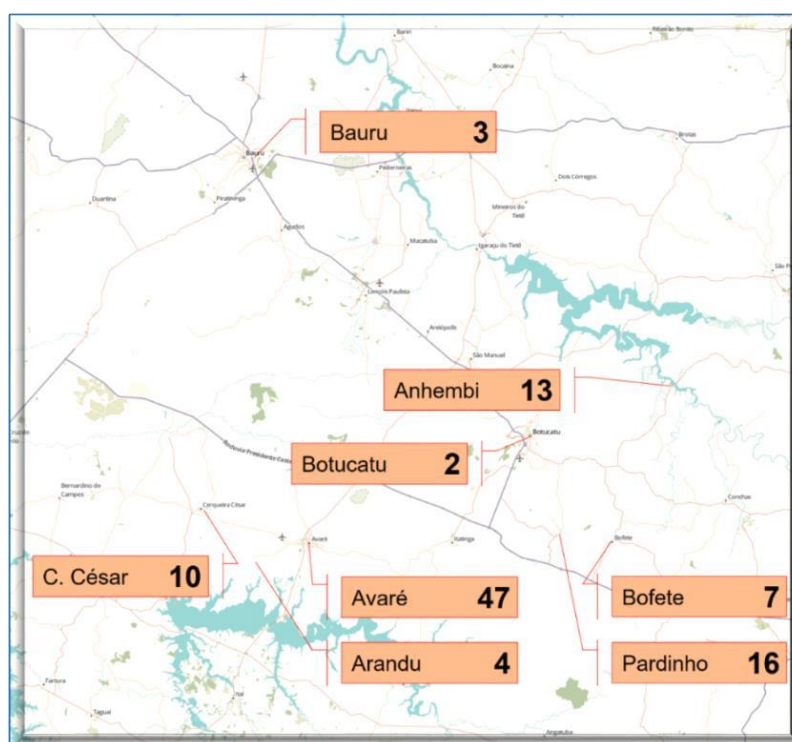
Foram coletadas amostras diretamente dos tanques de refrigeração individuais de 102 pequenas propriedades leiteiras da região Centro-Oeste de São Paulo, retirando-se uma amostra de 100 mL de leite de tanque de refrigeração por propriedade. O número de amostras estudadas baseou-se em uma estimativa da prevalência de 4%, como mostram alguns estudos com *C. burnetii* no país (Mioni *et al.*, 2019b).

As propriedades possuíam característica de agricultura familiar, ou seja, área e renda de acordo com o Programa Nacional de Fortalecimento da

Agricultura Familiar (PRONAF). Foram organizadas em até quatro módulos fiscais, possuíam receita financeira anual característica de uma unidade familiar, e mão de obra predominantemente familiar (BARCELLOS *et al*, 2019).

Localizadas em oito municípios, abrangendo a região Centro-Oeste Paulista, a saber: Anhembi (13 amostras), Avaré (47 amostras), Arandu (4 amostras), Bofete (7 amostras), Botucatu (2 amostras), Bauru (3 amostras), Cerqueira Cesar (10 amostras) e Pardinho (16 amostras) (Figura 2). Todas as amostras de leite foram encaminhadas também para laticínios da região estudada. Todas as fazendas amostradas forneciam leite para laticínios fiscalizados pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF).

Figura 2 - Localização dos municípios de coletas e número de amostras de leite de tanque coletadas de cada município.

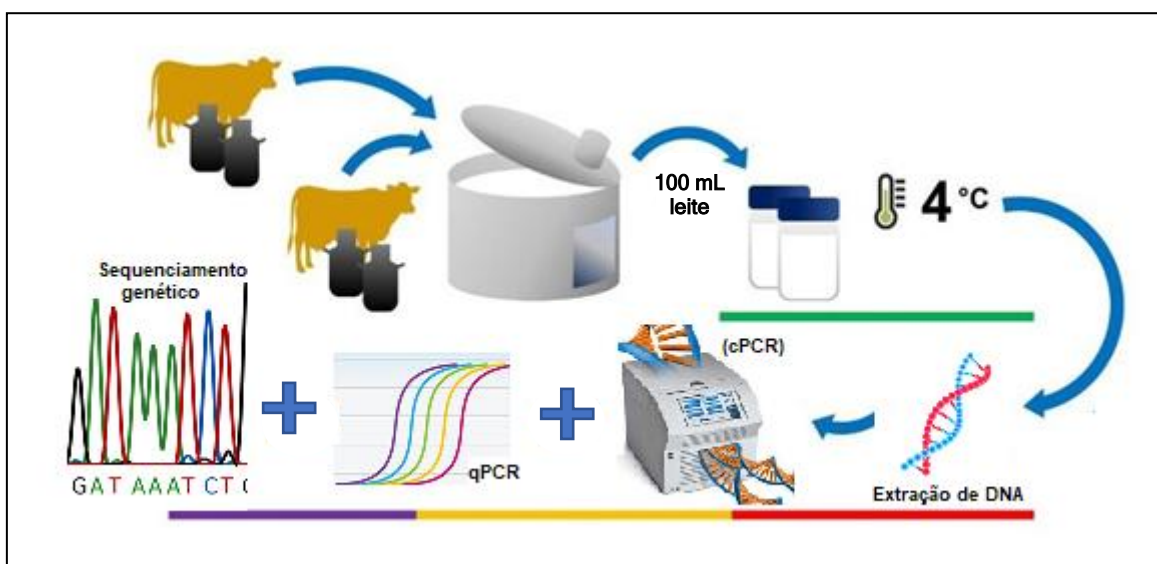


Fonte: Amanda Bezerra Bertolini

Os tanques de refrigeração seguiram critérios para que o leite pudesse ser coletado, dentre eles: estar com a temperatura máxima de 4°C, e não deveriam armazenar leite de ordenhas realizadas a mais de 48 horas (dois dias). Previamente à coleta, o agitador do tanque foi ligado para que o leite fosse homogeneizado por pelo menos cinco minutos e, após este período, com um auxílio de uma concha inox previamente esterilizada, foi coletado o volume de 100 mL para um frasco estéril, o qual foi acondicionado em caixa isotérmica contendo gelo reciclável.

Em seguida, o material foi encaminhado ao laboratório para as análises moleculares, permanecendo em freezer a -20°C até o momento da extração de DNA. A Figura 3 apresenta o fluxograma da metodologia utilizada para as coletas de leite e análises moleculares realizadas na presente pesquisa.

Figura 3 - Esquema do procedimento de coleta das amostras de leite bovino e análises moleculares de PCR e qPCR para *Coxiella burnetii*.



**Fonte:** Bertolini, 2019 (modificado pelo autor)

### 4.3. Local de realização dos exames

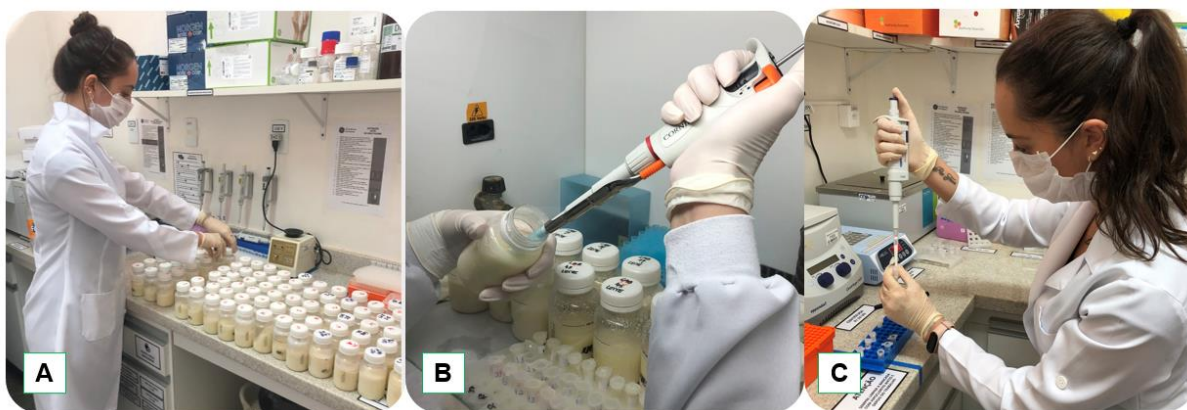
Os procedimentos moleculares (Reação em Cadeia da Polimerase – PCR, Nested PCR) foram realizados no Laboratório de Sanidade Animal de Bauru (LASAB) da APTA/SAA – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – Sede Bauru. O procedimento de PCR em tempo real (qPCR) foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais, do Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) em Botucatu. As reações de sequenciamento foram realizadas por uma empresa terceirizada em Botucatu-SP.

### 4.4. Exames moleculares

#### 4.4.1. Extração de DNA – leite

A extração do DNA das amostras de leite foi realizada com Kit comercial GFX Genomic Blood (GE Healthcare®), seguindo-se as recomendações de Cunha *et al.* (2006). A Figura 4 apresenta as etapas do procedimento.

Figura 4 - Procedimento de extração de DNA a partir de leite bovino. Separação das amostras (A). Processamento das amostras de leite (B). Extração de DNA com kit específico (C).



Fonte: Elaborada pelo autor/Arquivo pessoal

Foram processados 300 µL do leite nos quais foram adicionados 900 µL da solução de lise em tubo de 1,5 mL, homogeneizando-se. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por cinco minutos. Realizou-se a centrifugação a 12000 rpm por 20 minutos. Após a centrifugação removeu-se o sobrenadante por aspiração. Do pellet realizou-se digestão inicial com lisozima (10 mg/mL) e proteinase K (20 mg/mL) e extração do DNA utilizando-se o Kit GFX (GE Healthcare®). Adicionou-se 500 µL da solução de extração à mistura e centrifugação a 10.000 x g por 4 minutos. Em seguida o sobrenadante foi transferido para a coluna GFX e centrifugado a 5.000 x g por 1 minuto.

O líquido coletado foi descartado e 500 µL de solução de extração foi adicionado novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500 µL da solução de lavagem foi adicionada à coluna e a mesma submetida à centrifugação a 20.000 x g por 3 min. Em seguida, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL e 200 µL de água Milli Q aquecida a 70°C foi utilizada para a eluição.

#### **4.4.2. Quantificação do DNA**

Para verificação da quantidade e qualidade de DNA, todas as amostras foram analisadas em espectrofotômetro NanoVue Plus® da GE Healthcare, Bioscience/UK. A quantificação das amostras pode ser visualizada no Apêndice A.

#### **4.4.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com iniciadores para a região específica IS1111**

O genoma de *C. burnetii* possui 20 cópias da transposase IS1111, que serve para detecção e diferenciação da bactéria; por esse motivo, foram

utilizados *primers* que identificam essa região, resultando em um produto de 687 pb (Mares-Guia *et al.*, 2018):

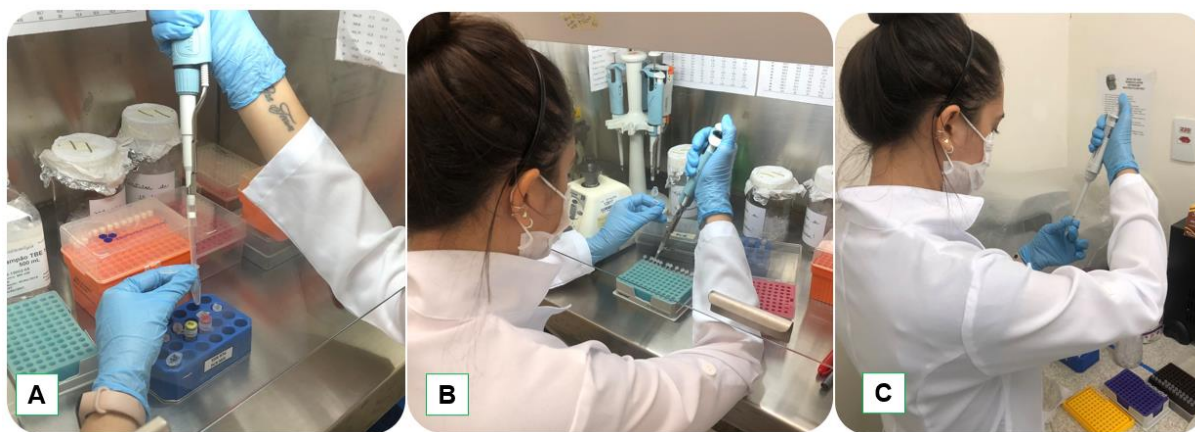
**TRANS1 (5'-TAT GTA TCC ACC GTA GCC AGT C-3')**

**TRANS2 (5'- CCC AAC AAC ACC TCC TTA TTC- 3')**

A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) foi realizada com 2,5 µL do DNA extraído (leite) adicionado ao tampão de PCR contendo 0,2 mM de dNTP, 20mM Tris-HCL (pH 8,4) + 50mM KCL (PCR buffer, Invitrogen), 1,5U de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen®) + MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM e 200 mM de cada *primer* Trans1 e Trans2 perfazendo um volume total de 50 µL. O procedimento pode ser visualizado na Figura 5. As condições de amplificação em termociclador (Eppendorf Mastercycle PRO) foram realizadas de acordo com Mares-Guia *et. al* (2018), sendo a desnaturação inicial em um ciclo de 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 30 segundos, temperatura de anelamento a 60°C durante 30 segundos e uma extensão de 72°C durante 1 minutos. Por fim, uma última etapa de extensão de 7 minutos a 72° C.

Figura 5 - Procedimento de Reação em Cadeia da Polimerase. Preparação do mix de PCR (A). Distribuição do mix de PCR (B). Adição do DNA extraído ao mix de PCR para

posterior inserção em termociclador (C).



Fonte: Elaborada pelo autor/ Arquivo pessoal

#### 4.4.4. Reação de Nested-PCR para a região IS1111 de *C. burnetii*

A reação de Nested PCR trata-se de outra amplificação, após a PCR convencional, que utiliza *inner primers*, ou seja, seleciona uma região mais específica dentro do produto da PCR. Desse modo, o procedimento de Nested utilizou: 2µL do produto da primeira PCR + 1 X PCR buffer 10 X, 0,2 uM de cada *primer* (N3+ e N4-), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 uM de dNTP mix e 0,5U de Platinum Taq Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), perfazendo um total de 25 uL de volume final. Estes *primers* foram desenhados para as regiões conservadas de diferentes sequencias de genes IS1111, resultando em um produto de 440 pb (Mares-Guia *et al.*, 2018)

**N3+(5´AAG CGT GTG GAG GAG CGA ACC 3´)**

**N4- (5´CTC GTA ATC ACC AAT CGC TTC GTC 3´)**

As condições de amplificação em termociclador (Eppendorf Mastercycle PRO) foram realizadas de acordo com Mares-Guia *et al.* (2018) consistindo em

um ciclo inicial a 95°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, e anelamento em 66°C por 30 segundos; e um ciclo de extensão de 72°C por 90 segundos e extensão final de 72°C por 5 minutos.

#### **4.4.5. Aquisição de cepas e controles**

Cepas referência de *Coxiella burnetti* (*Nine Mile*) foram utilizadas como controle positivo (Pacheco *et al.*, 2013). Como controle negativo foi utilizado água ultra pura estéril.

#### **4.4.6. Eletroforese em gel de agarose**

A identificação dos produtos amplificados foi realizada pela eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com Syber safe® (Invitrogen), e submetido à corrida eletroforética em cuba horizontal HE99 (Amersham Biosciences) contendo TBE 1X (0,1M Tris, 0,09m de ácido bórico e 0,001M de EDTA). A voltagem utilizada foi de 80V por aproximadamente 90 minutos.

Para o padrão de peso molecular, foi utilizado o DNA Ladder 100pb (Invitrogen) e o tamanho dos fragmentos amplificados foram verificados a partir da comparação visual com os padrões de peso molecular e com a cepa padrão utilizada como controle positivo utilizando-se o foto-documentador digital Major Science.

#### **4.4.7. Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) utilizando o Sybr Go Taq**

A técnica de qPCR–teve como alvo o gene de repetição da região

conservada de *C. burnetii* IS1111. A curva de *melting* foi captada por padrões de fluorescência. O protocolo foi desenvolvido de acordo com Vaidya *et al.* (2010), utilizando os *primers* Trans- 3 e Trans- 4.

**Trans 3 (5'- GTAACGATGCGCAGGCGAT-3')**

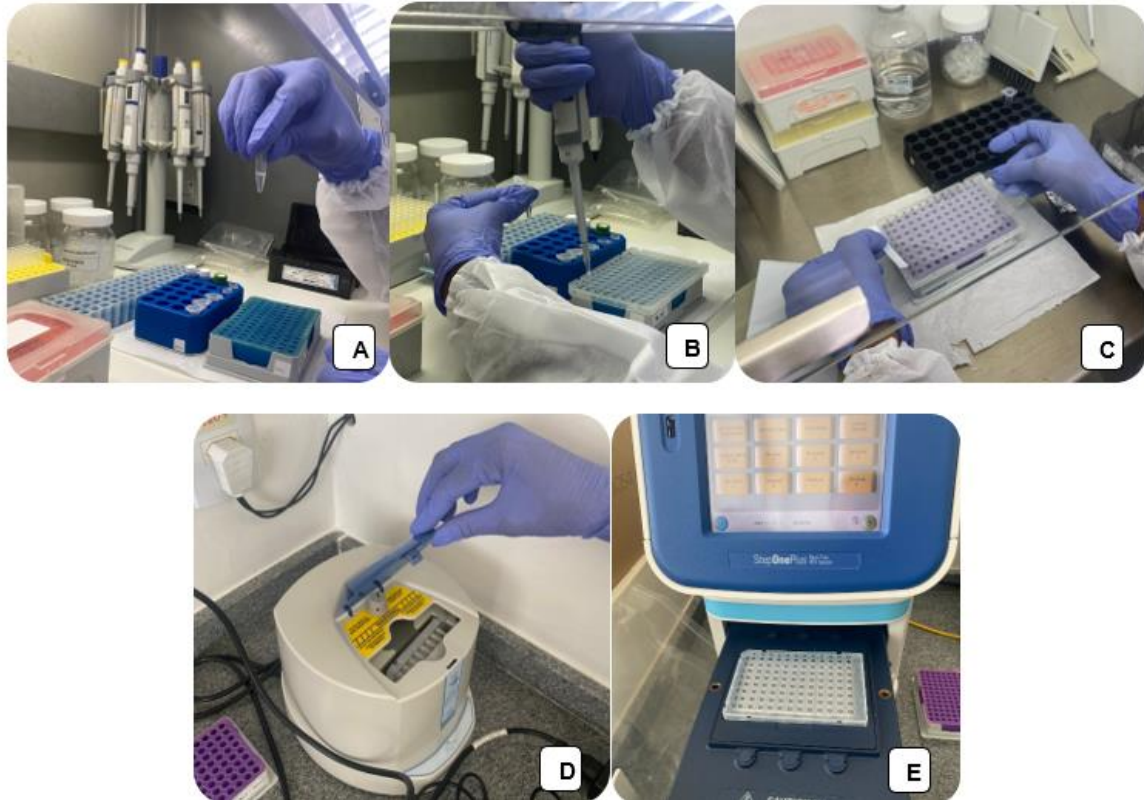
**Trans 4 (5'-CCACCGCTTCGCTCGCTA-3')**

O volume final foi de 20 µL, contendo 5pMol de cada *primer*, 10 µL de SYBR GoTaq™ qPCR Master Mix (Promega®), 7 µL de água ultra pura e 2 µL do DNA para preparação do min (Figura 6-A). Cada amostra foi colocada em um poço de placa de 96 poços (Figura 6-B) e posteriormente selada com filme adesivo óptico própria para permitir a leitura e captação da fluorescência pelo equipamento Step One™ Plus Real Time PCR System (Life Technologies®, Carlsbad, USA) (Figura 6-C).

Posteriormente, a placa foi centrifugada (Figura 6-D) e levada ao termociclador (Figura 6-E). A PCR em tempo real foi realizada em um ciclo inicial de 95°C por 10 min, 40 ciclos de 94°C por 30 s, 61°C por 30 s, e 72°C por 1 min. A fluorescência foi captada ao fim de cada ciclo e a curva de dissociação foi analisada em 95°C por 30s, seguido de 61°C por 30s e um passo gradual de 95°C em 2°C/ min.

O processo teve como controle positivo o DNA da cepa Nine Mile. Depois de completa a curva, a temperatura de *melting* foi registrada em aproximadamente 86,91°C.

Figura 6 - Procedimento de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR). Preparação do mix de PCR (A). Distribuição do mix de PCR (B). Aplicação de película específica para inserção no termociclador (C). Centrifugação da placa (D). Inserção da placa no termociclador (E).



**Fonte:** Elaborada pela autora/ Arquivo pessoal

#### **4.4.8. Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) utilizando a sonda Taqman**

A técnica de qPCR com a sonda Taqman teve como alvo o gene de repetição da região conservada de *C. burnetii* IS1111. O protocolo foi desenvolvido de acordo com Mioni *et al.* (2022), utilizando os *primers* IS-202 (forward) e IS-249 (reverse) e a sonda específica para *Coxiella burnetii*, conforme descrito abaixo:

**IS-202 (5'-TGT ATC CAC CGT AGC CAG TC-3')**

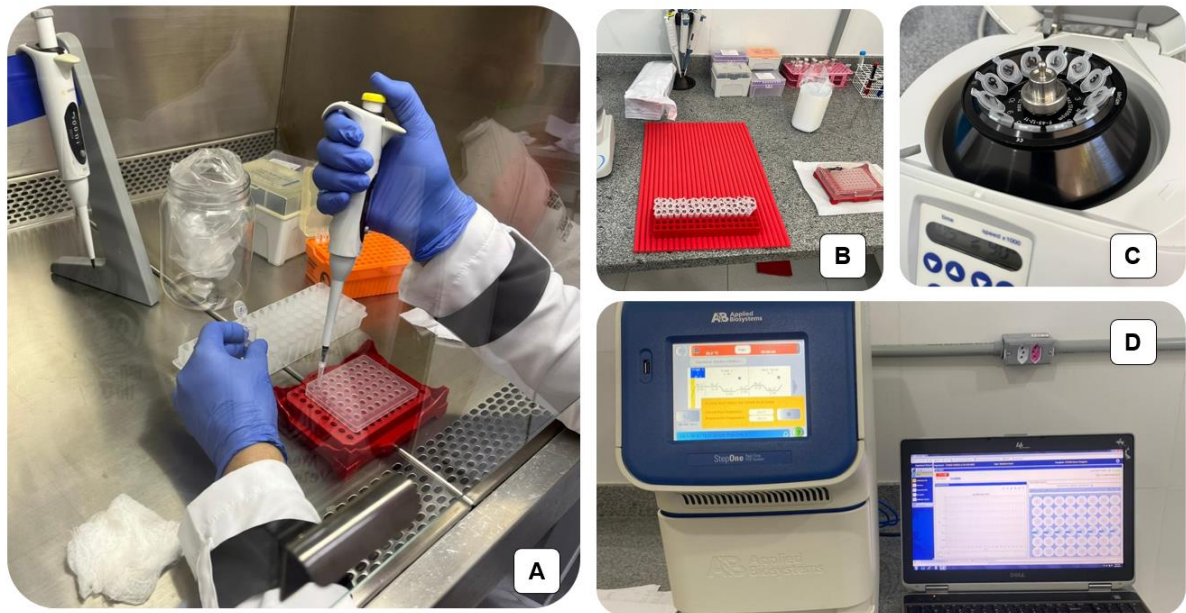
**IS-249 (5'-TGG TTC GCT CCT CCA CAC-3')**

**Sonda (5'-FAM-TAA GGT GGG CTG CGT GGT GAT GG BQH1-3')**

A reação qPCR para sonda foi realizada com volume final de 25 µl, contendo 320nM de cada *primer*, 200 nM de sonda específica (FAM-BHQ1), 1X TaqMan PCR Master Mix Universal (Applied Biosystems®) e 6,6 µL de água nuclease-free e 5µL do DNA de cada amostra. Como controle positivo foi utilizado o DNA da cepa *Nine Mile*, referência para identificação de *C. burnetii*.

Cada amostra foi colocada em um poço de uma placa de 96 poços e posteriormente selada com filme adesivo óptico que possibilita a leitura do equipamento. As condições de ciclagem foram 50° por 2 minutos, 95° por 10 minutos e 40 ciclos de 95° por 15 segundos e 60° por 1 minuto. A fluorescência foi gravada ao final de cada ciclo, pelo equipamento da Step-One™ Plus Real Time PCR System (Life Technologies®, Carlsbad, USA) (Figura 7).

Figura 7 - Procedimento de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) utilizando a sonda. Preparação do mix de qPCR (A). Amostras de DNA e mix preparado (B). Centrifugação das amostras de DNA (C). Termociclador Step-One utilizado (D).



Fonte: Elaborada pela autora/ Arquivo pessoal

#### 4.5. Sequenciamento

As reações de sequenciamento a partir dos produtos da PCR convencional foram realizadas por uma empresa terceirizada de Botucatu-SP (*Genotyping*) pela técnica de sequenciamento Sanger. Previamente as amostras foram submetidas à purificação de DNA, realizada pela mesma empresa. Os *amplicons* foram visualizados (software Chromas 2.6.6) e submetidos ao BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). O software é disponibilizado online de maneira gratuita e realiza comparações de similaridade entre a sequência dada pelo pesquisador com todas as sequências disponíveis no banco de dados do GenBank.

#### 4.6. Genotipagem

A técnica de genotipagem da amostra de melhor material genético foi realizada pelo método de *Multi Spacers Typing* (MST), utilizando *primers* descritos por Glazunova *et al.* (2005) via reação em cadeia da polimerase (PCR). Realizou-se amplificação de PCR utilizando 33,5 µL de água, 1X de Phusion HF Buffer™, 200 µM de dNTP, 0,5 µM de cada primer forward e reverso, 0,02 U/µL de Phusion DNA polimerase e 2 µL de DNA. As condições de ciclagem foram compostas por 98 °C por 30 s, 40 ciclos de 98 °C por 10 s, 57 °C por 30 s e 72 °C por 1 min, uma etapa final de extensão de 72 °C por 10 min e mantida a 4 °C.

Os produtos de PCR foram enviados para sequenciamento Sanger e os resultados foram analisados usando Bioedit™ (Ibis Bioscience, Carlsbad, CA, EUA) para criar uma sequência de consenso baseada em cada primer direto e reverso. As sequências de consenso de cada espaçador de Cox foram então comparadas no site [https://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella\\_burnetii/spacers.html](https://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella_burnetii/spacers.html) da instituição Méditerranée Infection para atribuir o tipo de MST.

#### 4.7. Georreferenciamento

Utilizando uma base de dados digital, o geoprocessamento foi realizado a partir do mapeamento dos isolados já sequenciados visando compreender espacialmente a distribuição de casos positivos na área de estudo. Para isso, foi utilizado o instrumento de Sistema de Informação Geográfica (SIG), e o software ArcGis 10.3, para a construção do banco de dados e elaboração de produtos cartográficos.

#### **4.8. Análise Estatística**

Para estimar uma prevalência suposta de 4% (Mioni *et al.*, 2019), foram utilizadas 102 amostras de leite de tanque de refrigeração de diferentes propriedades localizadas na região Centro-Oeste paulista. O cálculo do tamanho das amostras foi realizado com o programa OpenEpi (DEAN *et al.*, 2015). A prevalência de *C. burnetii* foi estimada com o respectivo intervalo de confiança de 95% (Clopper-Pearson) de acordo com os resultados da PCR do leite de tanque. Foi realizada a análise do coeficiente Kappa entre os métodos moleculares empregados a fim de verificar a concordância entre eles, utilizando o programa estatístico Sigma.

# *Resultados*

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Coleta do leite e análise das propriedades**

Durante as visitas à propriedades, já havia sido observado no momento das coletas de leite vários fatores de risco para a contaminação do leite bovino dentro dos tanques de refrigeração. Fatores como presença de animais de várias espécies, alguns com sintomas respiratórios (secreção nasal) e digestórios (diarreia), ambientes sujos, presença de esgoto, entulhos e depósitos de lixo. Importante salientar que, em duas propriedades, foram encontrados suínos, e em uma delas, o animal encontrava-se em trabalho de parto bem ao lado de um tanque de refrigeração. Observou-se também um leitão lambendo os restos de leite da saída do tanque de refrigeração em uma outra propriedade (Figura 8).

Figura 8 - Suíno em trabalho de parto ao lado do tanque de refrigeração (A) e leitão bebendo restos de leite da saída do tanque de refrigeração no momento da coleta de leite (B).



Fonte: Bertolini, 2019

## 5.2. Quantificação do DNA a partir da extração do leite

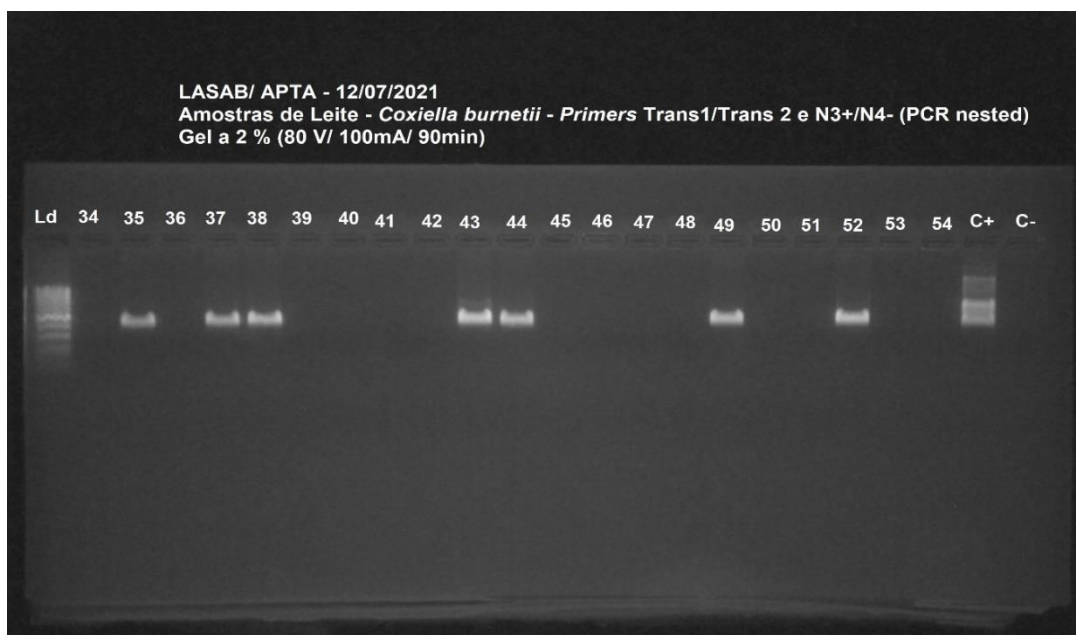
O resultado da quantificação de DNA das 102 amostras de leite que passaram por extração está detalhado no Apêndice A. De maneira geral, as amostras quantificadas perfizeram uma relação 260/280 que variou de 1,204 a 2,571. Os DNAs se encontravam em concentrações que variavam de 4,7 ng/μl a 92 ng/μl.

## 5.3. Análise molecular

### 5.3.1. Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (PCR convencional)

A análise molecular a partir das técnicas de extração, PCR/Nested-PCR e eletroforese indicaram dezesseis amostras positivas para *Coxiella burnetii* (16/102), perfazendo detecção de 15,68%. A Figura 9 apresenta o gel de eletroforese com bandas positivas verificadas em fotodocumentador.

Figura 9 – Amostras de leite de tanque positivas para *C. burnetii*. Gel de agarose a 2%. Primers Trans1/Trans2 e N3+/N4- (Nested-PCR).



Legenda: Ld – Ladder (padrão de 100 pares de base) C+ controle positivo. C- controle negativo. Os números representam as amostras testadas. Amostras 35, 37, 38, 43, 44, 49 e 52 apresentam banda (positivas). Demais numerações, amostras negativas. **Fonte:** Arquivo pessoal

As informações referentes às amostras positivas se encontram na Tabela 1. De acordo com os achados, das 16 amostras positivas, cinco (31,25%) pertenciam ao município de Avaré, duas (12,5%) ao município de Cerqueira César, duas (12,5%) ao município de Arandu, três (18,75%) ao município de Bofete, duas (12,5%) ao município de Pardinho e os municípios de Bauru e Anhembi com uma amostra positiva (6,25%) cada um. O município de Botucatu apresentou resultado negativo para *C. burnetii*.

Tabela 1. Detecção de *C. burnetii* em leite de bovinos por Reação em Cadeia da Polimerase – Nested-PCR

| Nº Amostra positiva | Cidade de origem | Detecção (%) |
|---------------------|------------------|--------------|
| 35, 37, 38, 43 e 44 | Avaré            | 31,25%       |
| 49 e 52             | Cerqueira César  | 12,5%        |
| 59 e 60             | Arandu           | 12,5%        |
| 62, 64 e 66         | Bofete           | 18,75%       |
| 71 e 74             | Pardinho         | 12,5%        |
| 93                  | Anhembi          | 6,25%        |
| 100                 | Bauru            | 6,25%        |

**Fonte:** Elaborado pelo autor

### 5.3.2. Sequenciamento genético

Todas as 16 amostras foram exitosamente sequenciadas e analisadas por bioinformática. De maneira geral todas as amostras demonstraram uma boa leitura, apresentando picos altos e singulares, conforme mostra o Apêndice B, contendo os eletroferogramas analisados.

Após a análise dos gráficos de sequenciamento, e comparação com amostras já presentes no banco de dados do GenBank, as amostras obtiveram uma semelhança entre 98,7% e 100% com as sequências do referido banco de dados.

Os isolados de *Coxiella burnetii* identificados de acordo com a semelhança entre as sequências identificadas nos leites de tanque de refrigeração do presente estudo e as sequências contidas no GenBank foram: 7T1, 28T1, 36T1, 54T1 e Isolado ZonVet2 (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação da semelhança entre as sequências das amostras de leite de tanque de refrigeração positivas para *Coxiella burnetti* e as sequências do Genbank

| Sequências contidas no Blastn | Sequências do estudo<br>(% semelhança) |
|-------------------------------|----------------------------------------|
| 7T1                           | Amostra 52 (100%)                      |
|                               | Amostra 60 (100%)                      |
|                               | Amostra 64 (99,56%)                    |
|                               | Amostra 74 (100%)                      |
| 28T1                          | Amostra 54 (99,22%)                    |
|                               | Amostra 100 (98,97%)                   |
| 36T1                          | Amostra 62 (100%)                      |
|                               | Amostra 71 (99,70%)                    |
| 54T1                          | Amostra 35 (99,73%)                    |
|                               | Amostra 37 (100%)                      |
|                               | Amostra 43 (98,87%)                    |
|                               | Amostra 44 (99,74%)                    |
|                               | Amostra 49 (100%)                      |
|                               | Amostra 66 (99,73%)                    |
|                               | Amostra 93 (99,74%)                    |
| ZonVet2                       | Amostra 38 (100%)                      |

### 5.3.3. Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) utilizando Sybr

Todas as 102 amostras testadas para PCR convencional foram testadas para a técnica de qPCR utilizando Sybr. Do total de amostras analisadas, vinte e duas (22/102) demonstraram amplificação. A prevalência estimada de *Coxiella burnetii* foi de 21,56%. Sete dos oito municípios apresentaram amostras positivas para *C. burnetii*, tendo-se apenas o município de Botucatu com resultados negativos.

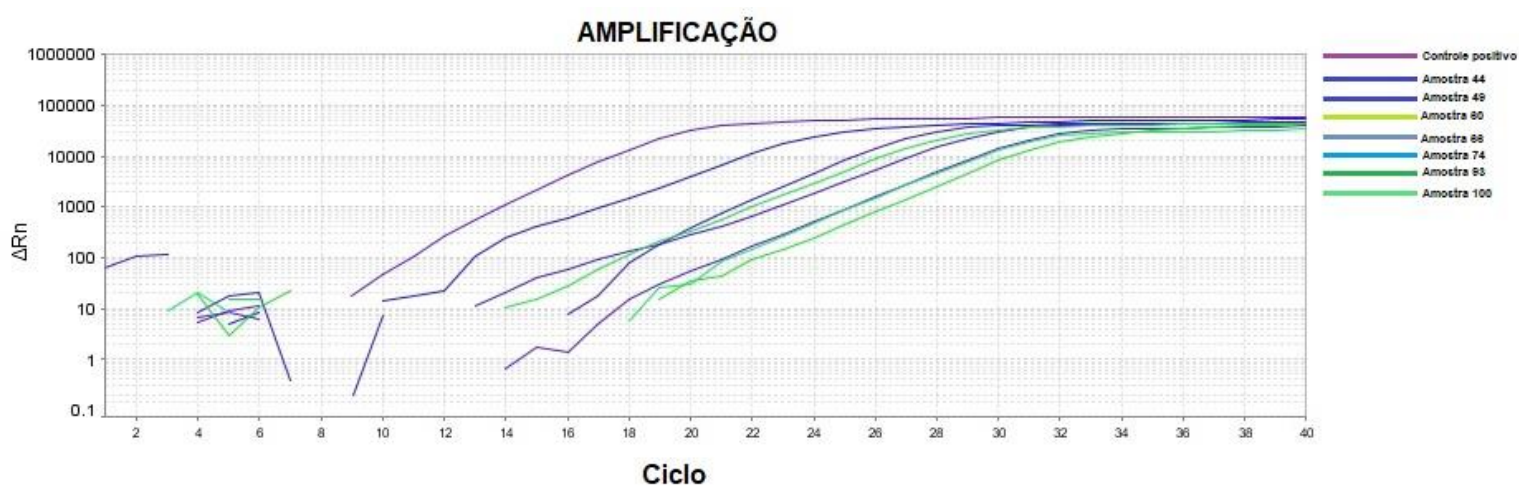
Das vinte e duas amostras positivas, quatro (18,18%) pertenciam ao município de Avaré, duas (9,09%) ao município de Cerqueira César, duas (9,09%) ao município de Arandu, quatro (18,18%) ao município de Bofete, quatro (18,18%) ao município de Pardinho, quatro (18,18%) ao município de Anhembi e duas (9,09%) ao município de Bauru. A procedência das amostras positivas à PCR em tempo real para os *primers* Trans 3 e Trans 4 está descrita na Tabela 3, enquanto que as curvas de amplificação estão representadas na Figura 10.

Tabela 3. Informações das amostras positivas de *C. burnetii* em leite bovino de tanque de refrigeração por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) – *Primers* Trans 3 e Trans 4

| Nº Amostra positiva | Cidade de origem | Detecção (%) |
|---------------------|------------------|--------------|
| 8, 19, 22 e 44      | Avaré            | 18,18%       |
| 49 e 52             | Cerqueira César  | 9,09%        |
| 58 e 60             | Arandu           | 9,09%        |
| 62, 63, 65 e 66     | Bofete           | 18,18%       |
| 74, 78, 80 e 81     | Pardinho         | 18,18%       |
| 85, 88, 93 e 96     | Anhembi          | 18,18%       |
| 100 e 101           | Bauru            | 9,09%        |

Fonte: elaborada pelo autor

Figura 10 – Exemplo de gráfico de amplificação de amostras positivas para qPCR/ Sybr



Fonte: elaborada pelo autor

#### 5.3.4. Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) utilizando a sonda

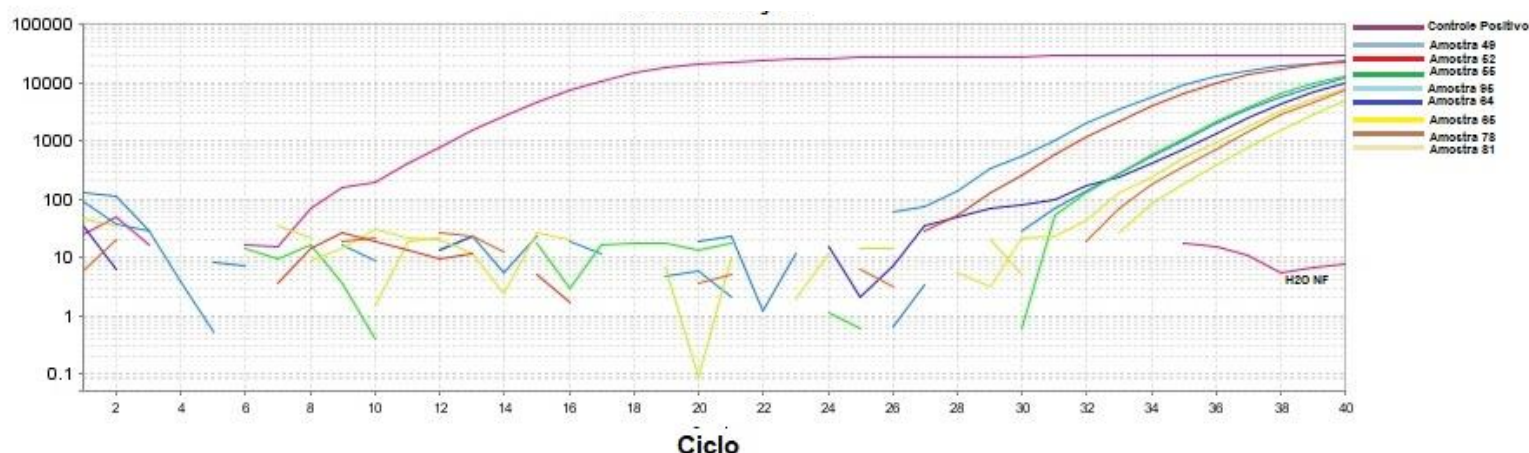
As 102 amostras foram testadas para a técnica de qPCR utilizando sonda. Do total de amostras analisadas, trinta e duas (32/102) demonstraram amplificação, portanto, a prevalência estimada de *Coxiella burnetii* foi de 31,37%. Sete dos oito municípios estudados possuíam amostras positivas para *C. burnetii*. Das trinta e duas amostras positivas para qPCR utilizando a sonda, doze (37,5%) pertenciam ao município de Avaré, três (9,35%) ao município de Cerqueira César, duas (6,25%) ao município de Arandu, cinco (15,62%) ao município de Bofete, quatro (12,5%) ao município de Pardinho, quatro (12,5%) ao município de Anhembi e duas (6,25%) ao município de Bauru. A procedência das amostras positivas à PCR em tempo real para os *primers* IS-202 e IS-249 está descrita na Tabela 4 e as curvas de amplificação por qPCR/Sonda estão representadas na Figura 11.

Tabela 4. Procedência das amostras positivas de *C. burnetii* em leite de bovinos por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) – *Primers* IS-202 e IS-249

| Nº Amostra positiva                             | Cidade de origem | Detecção (%) |
|-------------------------------------------------|------------------|--------------|
| 2, 8, 12, 19, 20, 22, 23<br>28, 34, 35, 37 e 44 | Avaré            | 37,5%        |
| 49, 52 e 55                                     | Cerqueira César  | 9,35%        |
| 58 e 60                                         | Arandu           | 6,25%        |
| 62, 63, 64, 65 e 66                             | Bofete           | 15,62%       |
| 74, 78, 79 e 81                                 | Pardinho         | 12,5%        |
| 88, 93, 95 e 96                                 | Anhembi          | 12,5%        |
| 100 e 101                                       | Bauru            | 6,25%        |

Fonte: elaborada pelo autor

Figura 11 - Exemplo de gráfico de amplificação de amostras positivas para qPCR/ Sonda



Fonte: elaborada pelo autor

### 5.3.5. Comparação das amostras positivas por técnica e município e análise de concordância entre os métodos

Ao analisar as amostras positivas em cada técnica, observou-se que a PCR convencional foi capaz de detectar *C. burnetii* em 16/102 amostras; a qPCR/Sybr em 22/102 amostras e a qPCR/Sonda em 32/102 amostras. É importante destacar que as técnicas tiveram resultados distintos quanto às amostras que se mostraram positivas. A tabela detalhada com as informações de detecção para cada técnica encontra-se no Apêndice C. Ao contabilizar todas as amostras que foram positivas para *C. burnetii* em pelo menos uma das técnicas, foi possível identificar 37/102 (36,27%) amostras positivas neste estudo.

Quando analisadas as três técnicas em conjunto, obteve-se um índice de concordância mediana (coeficiente Kappa 0,463). Observou-se identificação de *C. burnetii* pelas três técnicas em 9/102 amostras (8,82%). Ao comparar as técnicas de Nested-PCR e qPCR/Sybr, obteve-se uma concordância mediana (coeficiente Kappa 0,4212), ambas as técnicas

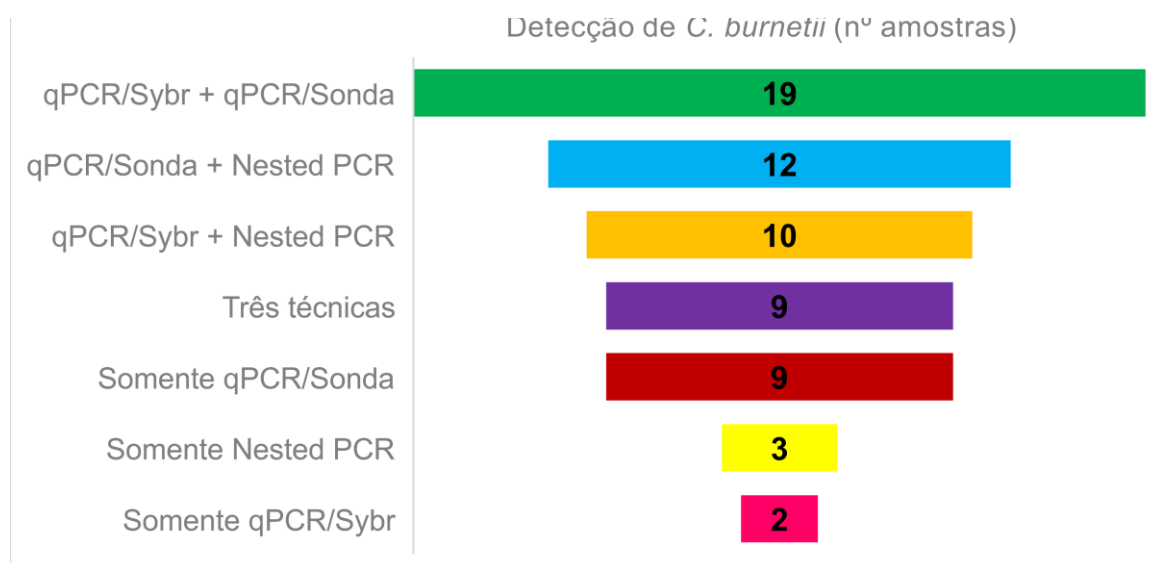
identificaram *C. burnetii* em 10/102 amostras analisadas (9,80%).

O menor índice de concordância foi observado entre as técnicas de Nested-PCR e qPCR/Sonda, obtendo um coeficiente Kappa de 0,3678, considerado baixo. Foram 12/102 (11,7%) amostras com detecção para *C. burnetii* por ambas as técnicas. Ainda que tenham identificado mais amostras positivas em comparação com qPCR/Syby vs. Nested-PCR, as técnicas pouco concordavam em quais amostras se mostravam negativas, justificando o baixo coeficiente Kappa. A maior concordância foi observada entre as técnicas de qPCR/sonda e qPCR/Sybr (coeficiente Kappa 0,602). Foi possível identificar *C. burnetii* por ambas as técnicas em 19/102 (18,62%) das amostras.

Também foi possível observar amostras que foram positivas somente em uma das técnicas. Três amostras (2,94%) foram identificadas somente pela técnica de Nested-PCR, duas (1,96%) somente pela qPCR/Sybr e nove (8,82%) somente pela qPCR/Sonda. Os gráficos abaixo demonstram visualmente os resultados (Figura 12).

Em relação aos municípios estudados, a cidade de Bauru obteve maior detecção para *Coxiella burnetii* pela sonda (p-valor: 0,0412). Os demais municípios não apresentaram diferenças entre si por nenhuma das técnicas empregadas.

Figura 12 - Detecção de *C. burnetii* ao analisar as técnicas em conjunto e separadamente



Fonte: elaborada pelo autor

#### 5.4. Genotipagem

A genotipagem foi realizada a partir das amostras 93, cuja similaridade e qualidade se demonstraram mais apropriadas para uma genotipagem bem sucedida. A partir do sequenciamento e análise, observa-se na tabela abaixo os resultados para a técnica de MST para sete espaços intergenicos de *C. burnetii* (Cox 2, 5, 18, 22, 37, 51 e 61):

Tabela 5 – Resultado da genotipagem de *C. burnetii* pela técnica de MST

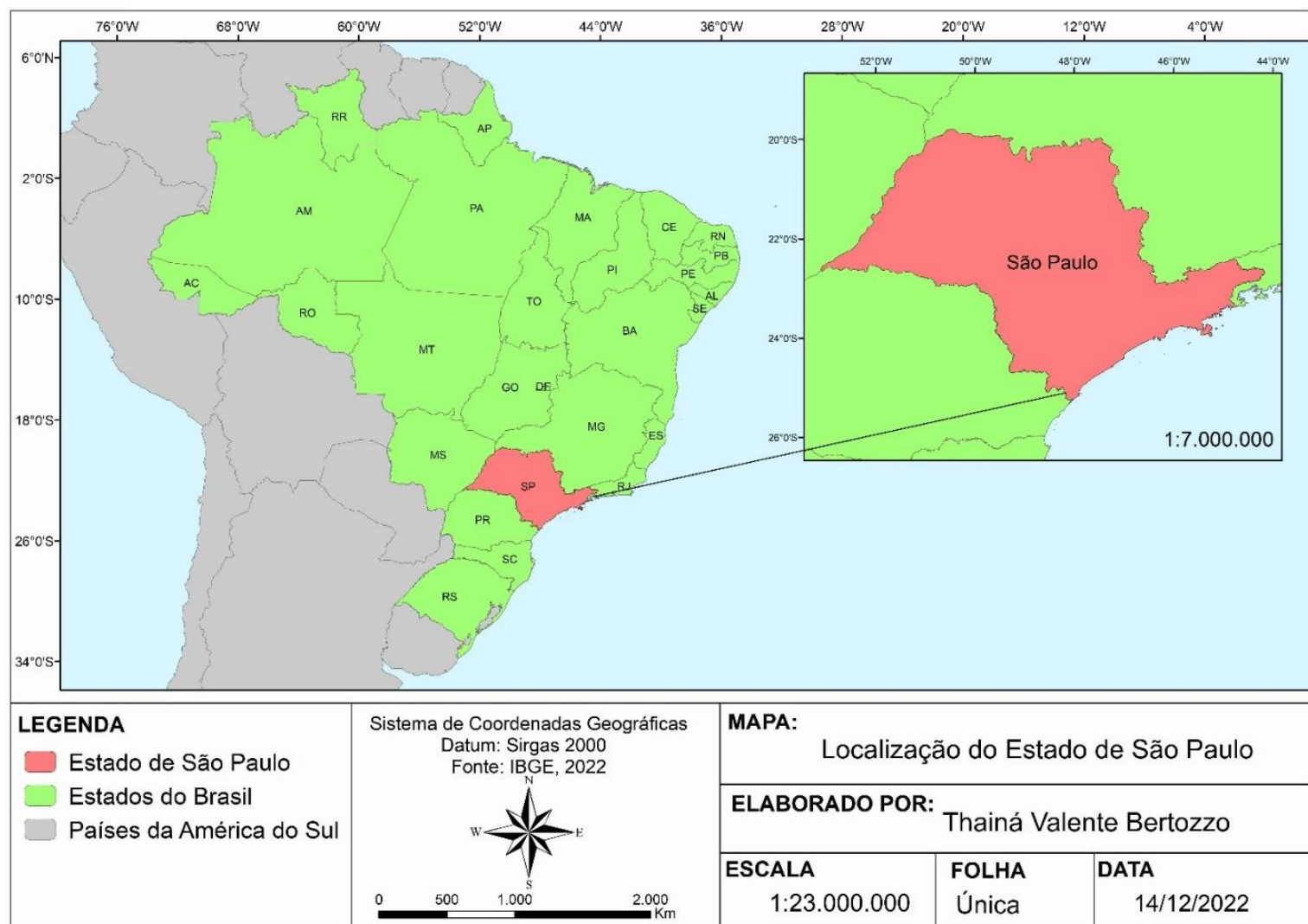
| MST  | Cox | Cox | Cox | Cox | Cox | Cox | Cox |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Loci | 2   | 5   | 18  | 22  | 37  | 51  | 61  |
|      | 3   | 2   | 6   | 5   | 10  | 4   | 5   |

A combinação dos alelos dos espaços intergênicos obtidos revelou a presença do genótipo ST61 nos leites de tanque de refrigeração.

### **5.5. Análise espacial, climática e demográfica dos municípios**

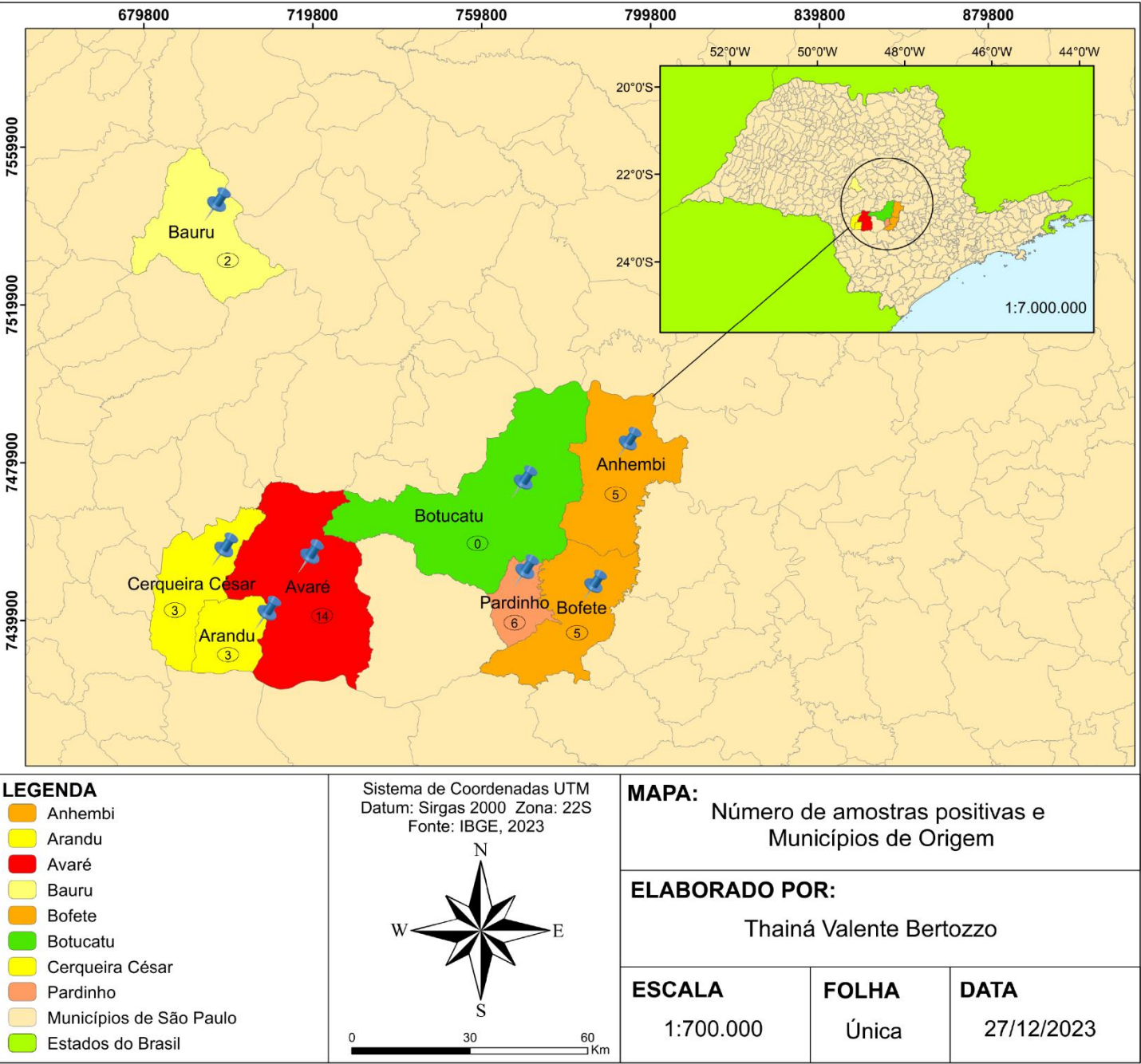
Os resultados obtidos por análise espacial com o software ArqGis estão sumarizados nas figuras 13 e 14, e apontam o local de estudo e as amostras positivas. Na Figura 13 observa-se o mapa do Brasil, e em destaque, o estado de São Paulo, região do país onde o estudo foi realizado. Na Figura 14 observa-se mais detalhadamente os municípios nos quais as 102 amostras de leite foram coletadas, evidenciando a quantidade de amostras positivas por município.

Figura 13 - Mapa do Brasil, evidenciando o estado de São Paulo, local de estudo.



Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 14 - Cidades incluídas no estudo e número de amostras positivas



Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 6 – Temperatura média e dados demográficos dos municípios estudados

| <b>Cidade</b>          | <b>Temperatura média</b> | <b>IDH</b> | <b>Densidade demográfica<br/>(hab/km<sup>2</sup>)</b> |
|------------------------|--------------------------|------------|-------------------------------------------------------|
| <b>Bauru</b>           | 22,3                     | 0,801      | 567,85                                                |
| <b>Anhembi</b>         | 21,7                     | 0,721      | 7,70                                                  |
| <b>Cerqueira Cesar</b> | 20,8                     | 0,729      | 41,96                                                 |
| <b>Botucatu</b>        | 20,5                     | 0,800      | 97,90                                                 |
| <b>Arandu</b>          | 20,7                     | 0,685      | 24,08                                                 |
| <b>Pardinho</b>        | 20,1                     | 0,727      | 34,08                                                 |
| <b>Bofete</b>          | 20,5                     | 0,705      | 16,01                                                 |
| <b>Avaré</b>           | 20,4                     | 0,767      | 76,51                                                 |

Fonte: IBGE, 2022

Das cidades estudadas, Bauru é a que possui a temperatura média mais alta (22,3 °C) e também maior Índice de Desenvolvimento Humano e densidade demográfica.

# *Discussão*

## 6. DISCUSSÃO

A bactéria *Coxiella burnetti*, causadora da febre Q, ocasiona uma importante zoonose, tendo em vista que a infecção pode ocorrer por aerossóis contaminados com produtos animais infectados, principalmente pelas espécies bovina, ovina e caprina, os quais podem ser dispersos pelo vento com muita facilidade, o que possibilita a infecção humana. A infecção em humanos pode variar desde a ausência de sinais ou evoluir para quadros graves e fatais, o que demonstra a gravidade desta enfermidade.

Tendo em vista que o Brasil possui grande número de ruminantes domésticos, a ocorrência de coxielose nesses animais pode trazer prejuízos ao produtor pelas alterações reprodutivas. Além disso, nos humanos, a Febre Q possui característica ocupacional, ou seja, grande número de trabalhadores estão expostos à zoonose. É importante que se tenham mais estudos acerca desta enfermidade, como o estudo presente, para que se possa alertar a população dos riscos da infecção, principalmente da ingestão do leite cru, em que os agentes infecciosos, se presentes, não são inativados.

O primeiro estudo molecular envolvendo a bactéria no país foi desenvolvido a partir de um único paciente que relatava contato constante com cabras e produtos de abortamentos (Lemos *et al.*, 2018). Estudos subsequentes relataram a presença de *C. burnetii* em animais a partir de amostras de sangue (Mares-Guia *et al.*, 2018), placenta (Oliveira *et al.*, 2018), bem como em animais de matadouro (Mioni *et al.*, 2020). Neste estudo, utilizou-se amostras provindas de leite de tanques de refrigeração. A amostragem realizada a partir desses tanques tem várias vantagens. Por fornecer uma amostra representativa para todas as vacas em lactação, é de fácil obtenção,

não invasivo, conveniente e econômico.

No presente estudo foi identificada a presença de *C. burnetii* em leite bovino cru (sem pasteurização) de pequenas propriedades rurais. Em relação aos produtos de animais de rebanho, outros estudos também identificaram a bactéria em leite cru sem pasteurização (Mioni *et al.*, 2019) e em queijos artesanais preparados a partir de leite sem a fervura em alta temperatura (Rozental *et al.*, 2020; Nascimento *et al.*, 2021).

Autores como Capuano *et al.* (2012) afirmam que produtos não pasteurizados possuem potencial infectivo ao ser humano dada à alta resistência de *C. burnetii*, que poderia sobreviver no alimento por um período prolongado. Simulações de análise de risco demonstraram que não se pode desprezar os riscos de transmissão de *C. burnetii* aos humanos pelo consumo de lácteos não pasteurizados, apesar dele ser menor em comparação com a inalação de aerossóis contaminados (Gale *et al.* 2015).

Durante as visitas às propriedades para coleta, vários fatores de risco para a contaminação do leite bovino dentro dos tanques de refrigeração foram observados. A presença de animais de várias espécies, alguns com sinais respiratórios (secreção nasal) e diarreia, ambientes sujos, presença de esgoto, entulhos e depósitos de lixo foram observados. De acordo com a EMBRAPA (2018), as paredes e pisos do local onde se encontram os tanques devem permitir que os mesmos sejam lavados diariamente. Locais e tanques mal lavados ou sujos podem prejudicar muito a qualidade do leite do tanque, aumentando a contagem bacteriana.

Além disso, foi observado uma fêmea suína em trabalho de parto, próxima ao tanque de refrigeração e, inclusive, se alimentando do leite que

escorria dos tanques. É importante frisar que, apesar de não ser comum em suínos, *Coxiella burnetii* já foi identificada nesses animais, portanto, não se pode excluir esse possível reservatório como fonte de transmissão da bactéria (Seo *et al.*, 2016a). Portanto, devido aos fatores de risco observados nas propriedades rurais, ressalta-se os esforços para a educação sanitária por meio da extensão rural na tentativa de educar os produtores de leite, para que estes riscos sejam minimizados e, com a educação estabelecida, sejam extintos.

Deve-se atentar também ao fato de que as principais rotas de entrada de *C. burnetii* em uma propriedade são formas semelhantes a esporos aerossolizados, transportados pelo vento (Nusinovici *et al.*, 2015) e a introdução de animais de outros rebanhos. Portanto, dependendo do tamanho e do grau de imunidade dos animais, a disseminação de *C. burnetii* aerossolizada na propriedade pode levar a infecção dos animais, com ocorrência de alterações reprodutivas (Van den Brom *et al.*, 2015). Não foi possível verificar se os animais deste estudo apresentavam desordens reprodutivas, tendo em vista que a amostra biológica estudada foi exclusivamente o leite dos animais, coletada diretamente dos tanques de refrigeração.

No presente estudo, a detecção da bactéria foi realizada a partir de métodos moleculares, tendo-se verificado *C. burnetii* em dezesseis amostras (15,68%) por Nested-PCR, vinte e duas (21,57%) pela qPCR/Sybr e trinta e duas (31,37%) pela qPCR/Sonda. Ainda que o método padrão-ouro para o diagnóstico de *C. burnetii* seja a Imunofluorescência Indireta (RIFI), métodos moleculares têm sido amplamente utilizados para a identificação de *C. burnetii*, com sucesso nos resultados, como verificado neste estudo. Vários testes baseados na Reação em Cadeia da Polimerase foram desenvolvidos com

intuito de detectar *C. burnetii* por diferentes sequencias-alvo: gene superóxido dismutase, RNA 16S-23S, gene com1, elemento repetitivo IS1111, plasmídeos, etc. (Eldin *et al.*, 2017).

A região alvo escolhida foi o gene IS1111. Rolain e Raoult (2005) citam que esta região é a mais sensível para a identificação da bactéria. Essa sequencia pertence a um grupo denominado “sequências de inserção” (IS) e são comuns em bactérias intracelulares obrigatórias devido às poucas oportunidades de troca genética. Estao envolvidos em rearranjos cromossômicos, no aumento da diversidade genética da bactéria e no potencial de virulência de *C. burnetii* (Marrie *et al.*, 2015).

A Nested-PCR foi uma técnica amplamente empregada para diagnóstico molecular de bactérias em diversos estudos, entretanto, autores afirmam que a técnica apresenta pouca especificidade (Eldin *et al.*, 2017). Por outro lado, estudos afirmam que a utilização de iniciadores internos aumentam a sensibilidade e aumenta 10.000 vezes o número de produto de PCR, obtendo-se menor número de falsos-negativos, sendo, portanto, uma alternativa diagnóstica quando testes mais robustos como a qPCR não está disponível (Mares-Guia 2015). Nosso estudo demonstrou dezesseis amostras positivas para Nested-PCR enquanto que a qPCR/Sonda identificou trinta e duas amostras positivas. Ainda que tenha identificado amostras positivas, de fato a Nested-PCR identificou apenas metade das amostras positivas, demonstrando, portanto, baixa sensibilidade.

Por sua vez, a técnica de PCR em tempo real (qPCR) demonstrou ser mais prática e, portanto, se tornou a mais usada no diagnóstico da febre Q (ELDIN *et al.*, 2017). Do mesmo modo, nossos resultados evidenciaram a boa

detecção da bactéria por este método molecular, tendo em vista a detecção de *C. burnetii* em trinta e duas amostras pela sonda.

A amostra com material genético de melhor qualidade foi selecionada para a técnica de multispacer sequence typing (MST) e genotipagem. Os métodos baseados em sequências de alta resolução, como MST, são comumente empregados em estudos moleculares atualmente para que se possa detectar qual tipo de genótipo está relacionado (MIONI, 2018).

A genotipagem de *C. burnetii* é útil uma vez que permite comparar as estirpes responsáveis pelo quadro infectivo e estabelecer uma relação entre o genótipo, a espécie animal, sua origem geográfica e virulência (Jodelko *et al.*, 2021; Kalaitzakis *et al.*, 2021), permite identificar fontes de infecção, ajuda a estabelecer medidas de controle (Menadi *et al.*, 2022), e a comparação em bases de dados internacionais permite uma melhor compreensão da epidemiologia da Febre Q (Kalaitzakis *et al.*, 2021), caracterizando-se, portanto, em uma importante ferramenta para compreensão da epidemiologia das doenças infecciosas, auxiliando no entendimento do ciclo biológico e possibilitando entender qual a fonte de infecção animal de surtos humanos.

Após o consenso e análise no banco de dados foi possível observar que a amostra genotipada neste estudo configura-se como ST61. Este genótipo pertence ao grupo genômico III. O genoma completo de *C. burnetii* foi publicado em 2003 (Seshadri *et al.*, 2003) e cerca de 74 genótipos distintos da bactéria foram identificados até o momento (Fu *et al.*, 2022). Isolados de *C. burnetii* são agrupados em seis “grupos genômicos” (GGs), alguns deles possuindo característica local enquanto outros encontram-se por todo o mundo (D’Amato *et al.*, 2016).

Resumidamente, os grupos genômicos I, II e III estão mais intimamente relacionados, enquanto o grupo genômico V mostrou o maior número de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e GG IV foi o mais distantemente relacionado em um estudo filogenético. Os isolados pertencentes ao GG I são os mais virulentos em modelos animais, seguidos por GG II e III. O GG IV e V mostram virulência moderada e os isolados GG VI parecem ser avirulentos (Metters *et al.*, 2019).

Também diferem em relação à distribuição geográfica: GG I e IV são encontrados no mundo todo, GG II é encontrado predominantemente na Europa e o GG V é encontrado na Nova Escócia e áreas vizinhas da América do Norte (Hemsley *et al.*, 2019). O GG III é frequentemente encontrado na Europa, nas Américas e na África, mas ainda não foi relatado na Austrália ou no Norte e na Ásia Central (Hemsley *et al.*, 2021).

A coxielose pode ser causada por múltiplos genótipos, porém, nem todos são infecciosos para humanos. Por exemplo, o genótipo pertencente ao mesmo GG do genótipo encontrado em nosso estudo, ST20, é circulante nos Estados Unidos e possui alta prevalência bovinos, entretanto, poucos casos de doença humana (Pearson *et al.*, 2014).

O subtipo encontrado neste estudo mostra a maior similaridade com ST20. Até o momento, ST61 foi descrito em bovinos leiteiros na Polônia; também em caprinos e bovinos na Bélgica e em pequenos ruminantes na Polônia (Szymańska-Czerwińska *et al.*, 2019; Jodelko *et al.*, 2021; Tomaiuolo *et al.*, 2021) sendo o presente trabalho o primeiro relato do subtipo 61 circulante no Brasil. Além disso, Mioni *et al.* 2019 realizaram uma análise filogenética com os seis espaçadores intergênicos que mostraram uma estreita relação entre o

novo tipo de sequência de cepas brasileiras (ST74) com ST20 e ST61.

O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo e representa o maior exportador de carne bovina, o segundo maior produtor de carne e o sexto maior produtor de leite no mundo (EMBRAPA, 2022). Tais dados demonstram que o país possui um número expressivo de animais, refletindo a importância da atividade pecuária no Brasil. Deste modo, a presença de *C. burnetii* e a possibilidade de adoecimento dos animais e dos trabalhadores que lidam com eles refletem o potencial negativo que surtos de coxielose podem causar, uma vez que causa distúrbios de gestação como infertilidade, abortamentos, natimortos e prematuros.

A carência da vigilância epidemiológica da febre Q no Brasil (Mares-Guia *et al.* 2016) e, particularmente, na região estudada (municípios da Região Centro-Oeste paulista), bem como os relatos observados em outras regiões na América do Sul, como Guiana Francesa (Eldin *et al.*, 2014), Chile (Cornejo *et al.*, 2020) e Uruguai (Somma-Moreira *et al.*, 1987), sugerem que a febre Q seja uma doença subdiagnosticada no Brasil.

Diante do número escasso de estudos envolvendo a epidemiologia da bactéria em produtos lácteos, sugere-se que há grande subnotificação de casos, fato que subestima os dados de prevalência da bactéria no país. Porém, os casos de doença em humanos e em animais supracitados, relatados nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Rio de Janeiro e Bahia indicam o caráter emergente da doença, em semelhança ao que ocorre em outros países do mundo.

A ocorrência de *C. burnetii* pode apresentar variação sazonal. A

sazonalidade está relacionada com o aumento da excreção bacteriana em animais no momento do parto (Basanisi *et al.*, 2022). Estudos demonstram que há observação de um padrão sazonal relacionado ao aumento do número de casos da doença durante os meses de primavera e verão (Asamoah *et al.*, 2021; Espí *et al.*, 2021).

Existe a preocupação de que as alterações climáticas possam alterar a distribuição geográfica e temporal de uma série de doenças infecciosas. Muitas doenças infecciosas são sensíveis ao clima, sendo que a sua emergência numa região depende de alterações ecológicas relacionadas a ela (OPAS *et al.*, 2021).

O Brasil é um país tropical de clima quente e possui vários rebanhos que favorece a transmissão zoonótica de agentes infecciosos (FRANÇA *et al.*, 2022). Nas áreas tropicais, a incidência de *Coxiella burnetii* está relacionada com o aumento de pluviosidade (ELDIN *et al.*, 2017). Nosso estudo abrangeu municípios da região Centro-Oeste paulista e as amostras de leite coletadas foram realizadas no verão. Pode-se verificar que o município de Bauru se destacou para detecção de *C. burnetii* de acordo com o número de amostras. Dentre as cidades estudadas é a que possui maior temperatura (Tm: 22,3 °C). Avaré também se destacou por ser o município com maior número de amostras coletadas (n=47), tendo-se detectado positividade em 14 (29,78%) amostras.

As propriedades leiteiras deste estudo são caracterizadas como pequenas propriedades de agricultura familiar. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2023), o cenário da produção leiteira vem se alterando desde 2021, com vários produtores saindo da atividade e redução do rebanho em vários estados do país, tendo-se destacado

o ano de 2022 por altos preços que se intensificaram com a entrada da entressafra, o que comprometeu o consumo de leite pela população, devido a questões econômicas do país que se configuraram por um cenário de desemprego e queda de salários dos trabalhadores (SILVA, 2023).

Além disso, esses fatores sinalizaram para a necessidade de políticas públicas para os médios e pequenos produtores, principalmente os produtores da agricultura familiar. Por ser uma atividade que garante o recebimento mensal pelo produto, muitos produtores, como os assentados, optaram por produzir leite para a garantia de renda mensal. Assim, a possível redução de sua participação na produção poderia, a curto e a médio prazo, excluí-los do mercado.

A queda da rentabilidade da produção de leite – devido à elevação dos custos de produção e à baixa qualidade nas pastagens – foi a razão principal para a queda na oferta e a consequente alta dos preços (FERREIRA *et al.*, 2023). Tais fatores são importantes e desafiadores para o pequeno produtor, já que a baixa qualidade nas pastagens e consequentemente diminuição de produção de leite, são fatores que irão refletir na sanidade dos rebanho, pelo estresse alimentar e diminuição de imunidade, facilitando as infecções por diferentes agentes patogênicos, como *Coxiella burnetti*.

Diante dos impactos negativos concernentes à presença de *C. burnetii* para a produção de leite, queda na rentabilidade, saúde geral do rebanho e risco à população e trabalhadores da área, este presente trabalho, para além da detecção da bactéria, mostra a importância da educação em saúde aos pequenos produtores de leite e demonstra a importância da testagem do rebanho para coxielose.

# *Conclusão*

## 7. CONCLUSÃO

- Foi possível verificar a ocorrência de *C. burnetii* em leite bovino procedente de tanques de refrigeração em propriedades leiteiras da região Centro-Oeste do Estado de São Paulo pelas três técnicas moleculares empregadas;
- Sete dos oito municípios estudados possuíam amostras de leite de tanques de refrigeração com DNA de *C. burnetii*;
- A concordância entre os três métodos moleculares se mostrou mediana;
- A qPCR/Sonda foi a técnica molecular que permitiu detectar maior número de amostras positivas para *C. burnetii*, enquanto que a Nested-PCR identificou menor número de amostras positivas;
- O genótipo identificado (ST61) está relacionado à infecções bovinas e de pequenos ruminantes e não havia sido até então encontrado no país, demonstrando ineditismo da circulação de tal genótipo.

## 8.REFERÊNCIAS\*

ABDALI F., HOSSEINZADEH S., BERIZI E., SHAMS S. Prevalence of *Coxiella burnetii* in unpasteurized dairy products using nested PCR assay. Iran J Microbiol. 10(4):220-226, 2018.

ABDELKADIR K, et al. Presence of *Rickettsia aeschlimannii*, '*Candidatus Rickettsia barbariae*' and *Coxiella burnetii* in ticks from livestock in Northwestern Algeria. *Ticks Tick Borne Dis*, Jun;10(4):924-928, 2019.

ALI A., OBAID M. K., ALMUTAIRI M. M., et al. Molecular detection of *Coxiella* spp. in ticks (Ixodidae and Argasidae) infesting domestic and wild animals: with notes on the epidemiology of tick-borne *Coxiella burnetii* in Asia. Front Microbiol, 14:1229950, 2023.

ALLAN-BLITZ L. T., SAKONA A., WALLACE W. D., KLAUSNER J. D. *Coxiella burnetii* Endocarditis and Meningitis, California, USA, 2017. Emerg Infect Dis. 24(8):1555-1557, 2018.

ANGELAKIS E., MEDIANNIKOV O., SOCOLOVSCHI C., et al. *Coxiella burnetii*-positive PCR in febrile patients in rural and urban Africa. Int J Infect Dis, 28:107-110, 2014.

ANGELAKIS E., RAOULT D. Q fever. *VetMicrobiol*, 140:297-309, 2010.

AOUADI A., et al. Molecular evidence of tick-borne hemoprotozoan-parasites (*Theileria ovis* and *Babesia ovis*) and bacteria in ticks and blood from small ruminants in Northern Algeria. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, Feb;50:34-39, 2017.

---

\*Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) – Julho 2023

ARJONA, F. B. S. Sistemas de informações geográficas: usos e aplicações na área da saúde. In: GONDIM, Grácia Maria de Miranda; CHRISTÓFARO, Maria Auxiliadora Córdova; MIYASHIRO, Gladys Miyashiro (Org.). Técnico de vigilância em saúde: fundamentos. v. 2. Rio de Janeiro: EPSJV. p. 113-136, 2017.

ARRICAU-BOUVERY, N., RODOLAKIS, A. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet. Res.* 36, 327–349, 2005.

ASAMOA, J. K. K., JIN, Z., & SUN, G. Q. Non-seasonal and seasonal relapse model for Q fever disease with comprehensive cost-effectiveness analysis. *Results in Physics*, 22, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2021.103889>

ASTOBIZA, I., *et al.* *Coxiella burnetii* shedding and environmental contamination at lambing in two highly naturally-infected dairy sheep flocks after vaccination. *Res. Vet. Sci*, 91, e58–e63, 2011.

BAE M., LEE H. J., PARK J. H., *et al.* Molecular diagnosis of *Coxiella burnetii* in culture negative endocarditis and vascular infection in South Korea. *Ann Med*, 53(1):2256-2265, 2021.

BARCELLOS, R., *et al.* Agricultura familiar e sanidade animal. *Veterinária e Zootecnia*. 26. 1-9, 2019.

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*. *Vet Microbiol*, 143(2-4):337-345, 2010.

BASANISI M. G., LA BELLA G., NOBILI G., *et al.* Detection of *Coxiella burnetii* DNA in sheep and goat milk and dairy products by droplet digital PCR in south Italy. *Int J Food Microbiol* ;366:109583, 2022

BÁRTOVÁ E., KUČEROVÁ H. L., ŽÁKOVSKÁ A., BUDÍKOVÁ M., NEJEZCHLEBOVÁ H. *Coxiella burnetii* and *Francisella tularensis* in wild small

mammals from the Czech Republic. *Ticks Tick Borne Dis.*;11(2):101350, 2020.

BAUD D., GREUB G. Intracellular bactéria and adverse pregnancy outcomes. *Clin Microbiol Infect.* Sep;17(9):1312-22, 2011.

BAUER A. E. *et al.* Estimated herd prevalence and sequence types of *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples from commercial dairies in Indiana. *BMC Vet Res*; 11: 186, 2015.

BENNETT M. D., WOOLFORD L., BANAZIS M. J., *et al.* *Coxiella burnetii* in western barred bandicoots (*Perameles bougainville*) from Bernier and Dorre Islands in Western Australia. *Ecohealth*, 8(4):519-524, 2011.

BERTOLINI, A. B. Isolamento, identificação molecular e detecção de genes de virulência de *Yersinia enterocolitica* em amostras de leite bovino de tanques de expansão de propriedades do Centrooeste Paulista. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Disponível em < <http://hdl.handle.net/11449/154124> > Acesso em 03 fev 2024

BORODUSKE A., TROFIMOVA J., KIBILDS J., *et al.* *Coxiella burnetii* (Q fever) infection in dairy cattle and associated risk factors in Latvia. *Epidemiol Infect.*; 145(10):2011-2019, 2017.

BRANDÃO H., RIBEIRO DO VALLE L. A., CHRISTOVÃO D. A. Investigação sobre a febre Q em São Paulo. 1. Estudo sorológico em operários de um frigorífico. *Arq Fac Hig Saúde Publ Univ São Paulo*, 7(1): 127-134, 1953.

BRANDI, G., SISTI, M., AMAGLIANIET, G. Evaluation of the environmental impact of microbial aerosol generated by wastewater treatment plants utilizing different aeration systems. *J. Appl. Microbiol.* 88, 845–852, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. PORTARIA Nº 264, DE 17 DE FEVEREIRO DE 2020. Altera a Portaria de Consolidação nº 4/GM/MS, de 28 de setembro de 2017, para incluir a doença de Chagas crônica, na Lista Nacional de

Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional. Disponível em

<[https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2020/prt0264\\_19\\_02\\_2020.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2020/prt0264_19_02_2020.html)> Acesso em 13 nov 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura. INSTRUÇÃO NORMATIVA No 50, DE 24 DE SETEMBRO DE 2013. Disponível em <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/arquivos-das-publicacoes-de-saude-animal/IN502013.pdf>> Acesso em 13 nov 2023.

CABRERA R., MENDOZA W., LÓPEZ-MOSQUERA L., *et al.* Tick-Borne-Agents Detection in Patients with Acute Febrile Syndrome and Ticks from Magdalena Medio, Colombia. *Pathogens*;11(10):1090, 2022.

CABRERA ORREGO R., RÍOS-OSORIO L. A., KEYNAN Y., RUEDA Z.V., GUTIÉRREZ L.A. Molecular detection of *Coxiella burnetii* in livestock farmers and cattle from Magdalena Medio in Antioquia, Colombia. *PLoS One*, 15(6):e0234360 2020.

CARAGUEL C., BASSETT S., GONZÁLEZ-BARRIO D., ELSWORTH P., CHABER A. L., 2020. Comparison of three serological tests for the detection of *Coxiella burnetii* specific antibodies in European wild rabbits. *BMC Vet Res*, 16: 315. doi: 10.1186/s12917-020-02526-w

CARBONERO A., GUZMÁN L. T., MONTAÑO K., TORRALBO A., ARENAS-MONTES A., SAA L. R. *Coxiella burnetii* seroprevalence and associated risk factors in dairy and mixed cattle farms from Ecuador. *Prev Vet Med*; 118(4):427-435, 2015.

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, 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Q fever. Available from: <http://www.cdc.gov/qfever/>. Acesso em 19 ago 23.

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

CEVA Santé Animale. Zoonosis causada por *Coxiella burnetii*. Disponível em < <https://ruminants.ceva.pro/es/coxiella-burnetii> > Acesso em 03 fev 2024.

CHEN H. W., CHING W. M. Development of loop-mediated isothermal amplification assays for rapid and easy detection of *Coxiella burnetii*. *J Microbiol Methods*, 107:176–181, 2014.

CHOCHLAKIS D., SANTOS A. S., GIADINIS N. D., *et al.* Genotyping of *Coxiella burnetii* in sheep and goat abortion samples. *BMC Microbiol*, 18(1):204, 2018.

CICUTTIN G. L., DEGIUSEPPE J. I., MAMIANETTI A., *et al.* Serological evidence of *Rickettsia* and *Coxiella burnetii* in humans of Buenos Aires, Argentina. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*; 43:57-60, 2015.

COOK, E.A. Epidemiology of zoonoses in slaughterhouse workers in Western Kenya. University of Edinburgh, 2014.

COOPER A., STEPHENS J., KETHEESAN N., GOVAN B. Detection of *Coxiella burnetii* DNA in wildlife and ticks in northern Queensland, Australia. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 13(1):12-16, 2013

CORNEJO J., ARAYA P., IBÁÑEZ D., *et al.* Identification of *Coxiella burnetii* in Tank Raw Cow Milk: First Findings from Chile. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 20(3):228-230, 2020.

COSTA P.S.G., BRIGATTE M.E., GRECO D.B. Antibodies to *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Ehrlichia chaffeensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100(8):853-859, 2005.

COSTA P.S.G., BRIGATTE M.E., GRECO D.B. Questing one Brazilian query: reporting 16 cases of Q fever from Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Tropical*, 48(1):5-9, 2006.

CUMBASSÁ A., BARAHONA M. J., CUNHA M. V., *et al.* *Coxiella burnetii* DNA detected in domestic ruminants and wildlife from Portugal. *Vet Microbiol*, 180(1-2):136-141, 2015.

CUNHA, M.L.R.S., *et al.* Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. *Braz. J. Microbiol.* v.37, n.1, p.70-74, 2006.

CYR J., TURCOTTE M. È., DESROSIERS A., *et al.* Prevalence of *Coxiella burnetii* seropositivity and shedding in farm, pet and feral cats and associated risk factors in farm cats in Quebec, Canada. *Epidemiol Infect*;149:e57, 2021.

DABAJA M. F., GRECO G., VILLARI S., *et al.* Occurrence and risk factors of *Coxiella burnetii* in domestic ruminants in Lebanon. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 64:109-116, 2019.

DAMASCENO, I.A.M.; GUERRA, R.C. *Coxiella burnetii* and Q fever in Brazil: a public health issue. *Ciência & Saúde Coletiva*, 23(12):4231-4239, 2018.

D'AMATO, F.; ELDIN, C.; RAOULT, D. The contribution of genomics to the study of Q fever. *Future Microbiol.* 11, 253–272, 2016.

DEAN, A. G., SULLIVAN K. M. AND SOE M. M. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health. Update 2015/05/04. Available at: [www.OpenEpi.com](http://www.OpenEpi.com). Acesso: 20 Mai 2020

DENISON A. M., THOMPSON H. A., MASSUNG R.F. IS1111 insertion sequences of *Coxiella burnetii*: characterization and use for repetitive element PCR-based differentiation of *Coxiella burnetii* isolates. *BMC Microbiol* ,7:91–98, 2007.

DEKA, R.P., et. al. Bovine brucellosis: prevalence, risk factors, economic cost and control options with particular reference to India- a review. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 8, 1556548, 2018.

DELSING, C.E., Kullberg, B.J., Bleeker-Rovers, C.P. Q fever in The Netherlands from 2007 to2010. *Neth. J. Med.* 68, 382–387, 2010.

DEVAUX C. A., OSMAN I. O., MILLION M. et al. *Coxiella burnetii* in Dromedary Camels (*Camelus dromedarius*): A Possible Threat for Humans and Livestock in North Africa and the Near and Middle East?. *Front Vet Sci*; 7:558481, 2020.

DIOUF F. S., NDIAYE E. H. I., HAMMOUD A., et al. Detection of *Coxiella burnetii* and *Borrelia* spp. DNA in Cutaneous Samples and in Household Dust in Rural Areas, Senegal. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 21(9):659-666, 2021.

DISEKO L. J., TSOTETSI-KHAMBULE A. M., ONYICHE T. E. et al. *Coxiella burnetii* infections from animals and ticks in South Africa: a systematic review [published online ahead of print, 2023 Aug 29]. *Vet Res Commun*.10.1007/s11259-023-10204-z, 2023.

DOBOS A., FODOR I., TEKIN T., ĐURIČIĆ D. et al Presence of *Coxiella burnetii* in dairy cattle and farms in the Czech Republic. *Pol J Vet Sci*, 25(2):231-235, 2022.

DOBOS A., KREIZINGER Z., KOVÁCS Á. B., *et al.* Prevalence of *Coxiella burnetii* in Central and Eastern European dairy herds. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 72:101489, 2020

DRAGAN A. L., VOTH D. E. *Coxiella burnetii*: international pathogen of mystery. *Microbes Infect.* Apr;22(3):100-110, 2020.

DURON O. The IS1111 insertion sequence used for detection of *Coxiella burnetii* is widespread in *Coxiella*-like endosymbionts of ticks. *FEMS Microbiol Lett*, 362:fnv132, 2015.

DURON O., *et al.* The importance of ticks in Q fever transmission: what has (and has not) been demonstrated? *Trends Parasitol*, 31(11):536–552, 2015.

ELDIN C., MAHAMAT A., DEMAR M., *et al.* Q fever in French Guiana. *Am J Trop Med Hyg*, 91(4):771-776, 2014.

ELDIN C., MÉLENOTTE C., MEDIANNIKOV O., *et al.* From Q Fever to *Coxiella burnetii* Infection: a Paradigm Change. *Clin Microbiol Rev.* 2017 Jan;30(1):115-190. doi: 10.1128/CMR.00045-16. PMID: 27856520; PMCID: PMC5217791.

EL-MAHALLAWY H. S., LU G., KELLY P., *et al.* Q fever in China: a systematic review, 1989-2013. *Epidemiol Infect.* 143(4):673-681, 2015.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Diagnóstico estratégico da cadeia produtiva da carne bovina para o estado de Goiás. Cartilha. Campo Grande, MS, 2022.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Higienização de tanques de resfriamento e armazenamento de leite cru. Cartilha. Brasília, DF, 2018.

EPELBOIN L., ELDIN C., THILL P., *et al.* Human Q Fever on the Guiana Shield and Brazil: Recent Findings and Remaining Questions. *Curr Trop Med Rep.*; 8(3):173-182, 2021.

ESMAEILI S., MOHABATI MOBAREZ A., KHALILI M., *et al.* Molecular prevalence of *Coxiella burnetii* in milk in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Trop Anim Health Prod*, 51(6):1345-1355, 2019 (a)

ESMAEILI S., MOHABATI MOBAREZ A., KHALILI M., *et al.* High prevalence and risk factors of *Coxiella burnetii* in milk of dairy animals with a history of abortion in Iran. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* Apr; 63:127-130, 2019 (b)

ESPÍ, A., CERRO, A., OLEAGA, Á., *et al.* One health approach: An overview of q fever in livestock, wildlife and humans in asturias (northwestern spain). *Animals*, 11(5), 2021. <https://doi.org/10.3390/ani11051395>

FERREIRA, D. *et al.* Inflação de alimentos: como se comportaram os preços em 2022. *Carta de Conjuntura*, Brasília, n. 58, nota de conjuntura 5, p. 1-19, 1. trim. 2023. Disponível em: [https://www.ipea.gov.br/cartadeconjuntura/wp-content/uploads/2023/01/230113\\_cc\\_58\\_nota\\_5\\_inflacao\\_agro.pdf](https://www.ipea.gov.br/cartadeconjuntura/wp-content/uploads/2023/01/230113_cc_58_nota_5_inflacao_agro.pdf). Acesso em: 11 jul. 2023.

FERREIRA M. S., GUTERRES A., ROZENTAL T., *et al.* *Coxiella* and *Bartonella* spp. in bats (Chiroptera) captured in the Brazilian Atlantic Forest biome. *BMC Vet Res.* 2018;14(1):279, 2018.

FOURNIER P.E., MARRIE T.J, RAOULT D. Mini review diagnosis of Q fever. *J Clin Microbiol.*; 36:1823–1834, 1998.

FRANÇA D. A., MIONI M. S. R., FORNAZARI F., *et al.* Seropositivity for *Coxiella burnetii* in suspected patients with dengue in São Paulo state, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*, 16(5):e0010392, 2022.

FRANGOULIDIS D., KAHLHOFER C., SAID A. S. *et al.* High Prevalence and New Genotype of *Coxiella burnetii* in Ticks Infesting Camels in Somalia. *Pathogens*, 10(6):741, 2021.

FU, M., HE, P., OUYANG, X., YU, Y. *et al.* Novel genotypes of *Coxiella burnetii* circulating in rats in Yunnan Province, China. *BMC Veterinary Research*, 18(1), 204, 2022. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03310-8>

GALE, P.; KELLY, L.; MEARNS, R.; *et al.* Q fever through consumption of unpasteurised milk and milk products - a risk profile and exposure assessment. *Journal of Applied Microbiology*, v. 118, n. 5, p. 1083–1095, 2015.

GLAZUNOVA, O.; ROUX, V.; FREYLIKMAN, O.; *et al.* *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerg. Infect. Dis.* 2005, 11, 1211–1217

GOLDENBERG R. L., *et al.* Infection-related still births. *Lancet*. Apr 24;375(9724):1482-90, 2010.

GRACE, D., *et al.* Mapping of poverty and likely zoonoses hotspots. London, UK. 2012.

GONG X. Q., XIAO X., LIU J. W., *et al.* Occurrence and Genotyping of *Coxiella burnetii* in Hedgehogs in China. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 20(8):580-585, 2020.

GUATTEO R., *et al.* Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: a critical review. *Vet Microbiol*, Apr 21;149(1-2):1-16, 2011.

HEMSLEY, C.M.; O'NEILL, P.A.; ESSEX-LOPRESTI, A. *et al.* Extensive genome analysis of *Coxiella burnetii* reveals limited evolution within genomic groups. *BMC Genom.* 20, 441, 2019

.

HEMSLEY, C.M.; ESSEX-LOPRESTI, A.; NORVILLE, I.H.; *et al.* Correlating Genotyping Data of *Coxiella burnetii* with Genomic Groups. *Pathogens* 10, 604, 2021.

HEMSLEY C. M., ESSEX-LOPRESTI A., CHISNALL T., *et al.* MLVA and com1 genotyping of *Coxiella burnetii* in farmed ruminants in Great Britain. *Vet Microbiol*, 277:109629, 2023.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA, IBGE. Rebanho bovino reduz em 2018, em ano de crescimento do abate e exportação, Pesquisa de pecuária municipal, 2019.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa da Pecuária Municipal: produção de origem animal, por tipo, 2021. Rio de Janeiro: IBGE, 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html>. Acesso em: 14 jul. 2023.

JAGER M. M. *et al.* Evaluation of a Diagnostic Algorithm for Acute Q Fever in an Outbreak Setting. *Clin and Vaccine Immunol*, 18(6):963-968; 2011.

JODEŁKO, A., SZYMAŃSKA-CZERWIŃSKA, M., ROLA, J. G. *et al* Molecular detection of *Coxiella burnetii* in small ruminants and genotyping of specimens collected from goats in Poland. *BMC Veterinary Research*, 17(1), 2021. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-03051-0>

KALAITZAKIS, E., FANCELLO, T., SIMONS, X., *et al.* *Coxiella burnetii* shedding in milk and molecular typing of strains infecting dairy cows in Greece. *Pathogens*, 10(3), 1–13, 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030287>

KAMANI J, BANETH G, GUTIÉRREZ R, *et al.* *Coxiella burnetii* and *Rickettsia conorii*: Two zoonotic pathogens in peridomestic rodents and their ectoparasites in Nigeria. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018;9(1):86-92. doi:10.1016/j.ttbdis.2017.10.004

KAZAR J. *Coxiella burnetii* infection. *Ann N Y Acad Sci*, 1063: 105–114, 2005.

KERSH G. J., PRIESTLEY R. A., HORNSTRA H. M., *et al.* Genotyping and Axenic Growth of *Coxiella burnetii* Isolates Found in the United States Environment. *Vector Borne Zoonotic Dis.*16(9):588-594, 2016.

KESHAVAMURTHY R., SINGH B. B., KALAMBHE D. G., *et al.* Prevalence of *Coxiella burnetii* in cattle and buffalo populations in Punjab, India. *Prev Vet Med*, 166:16-20, 2019.

KILICOGLU Y., CAGIRGAN A. A., SERDAR G., *et al.* Molecular investigation, isolation and phylogenetic analysis of *Coxiella burnetii* from aborted fetus and ticks. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 73:101571, 2020.

KIM S. G. *et al.* *Coxiella burnetii* in bulk tank Milk samples, United States. *Emerg Infect Dis*, 11(4): 619–621, 2005.

KLEE, S.R., *et al.* Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. *BMC Microbiol.* 6, 2, 2006.

KNAP N., ŽELE D., GLINŠEK BIŠKUP U., *et al.* The prevalence of *Coxiella burnetii* in ticks and animals in Slovenia. *BMC Vet Res*, 15(1):368, 2019.

LAFI S. Q., TALAFHA A. Q., ABU-DALBOUH M. A., *et al.* Seroprevalence and associated risk factors of *Coxiella burnetii* (Q fever) in goats and sheep in northern Jordan. *Trop Anim Health Prod*, 52(4):1553-1559, 2020.

LEMOS E. R. S., *et al.* Q Fever as a Cause of Fever of Unknown Origin and Thrombocytosis: First Molecular Evidence of *Coxiella burnetii* in Brazil. *Vector Borne and Zoonotic Dis*, 11(1):85-87, 2011.

LEMOS E. R. S., ROZENTAL T., SIQUEIRA B. N., *et al.* Q Fever in Military Firefighters during Cadet Training in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 99(2):303-

305, 2018.

LIMONARD, G.J., *et al.* Detailed analysis of health status of Q fever patients: 1 year after the first Dutch outbreak: a case–control study. *QJM* 103, 953–958, 2010.

MADARIAGA M. G., *et al.* Q fever: a biological weapon in your backyard. *Lancet Infect Dis.*, 3:709–721, 2003.

MAGADU R., THOMPSON P. N. Seroprevalence and factors associated with *Coxiella burnetii* exposure in goats in Moretele. *Onderstepoort J Vet Res*, 90(1):e1-e7, 2023.

MAGALHÃES G. B., O uso do geoprocessamento e da estatística nos estudos ecológicos em epidemiologia: o caso da dengue em 2008 na região metropolitana de Fortaleza, *Hygeia*; 8(15): 63-77, 2012.

MAGOURAS I., HUNNINGHAUS J. , SCHERRER S., *et al.* *Coxiella burnetii* Infections in Small Ruminants and Humans in Switzerland. *Transbound Emerg Dis.*; 64(1):204-212, 2017.

MANGENA M., GCEBE N., PIERNEEF R., *et al.* Q Fever: Seroprevalence, Risk Factors in Slaughter Livestock and Genotypes of *Coxiella burnetii* in South Africa. *Pathogens*, 10(3):258, 2021.

MARES-GUIA M. A. M. M. ,*et al.* Molecular identification of the agent of Q fever – *Coxiella burnetii*– in domestic animals in State of Rio de Janeiro, Brazil. *Ver Soc Bras Med Trop*, 47(2):231-234, 2014.

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. 166f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2015

MARES-GUIA M. A., ROZENTAL T., GUTERRES A., *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*, 94(5):1090-1094, 2016.

MARES-GUIA M. A. M. M., *et al.* Clinical and epidemiological use of nested PCR targeting the repetitive element IS1111 associated with the transposase gene from *Coxiella burnetii*. *Braz J Microbiol*, Jan - Mar;49(1):138-143, 2018.

MARRIE, T. J.; MINNICK, M. F.; TEXTORIS, J. *et al.* Molecular Medical Microbiology. Second ed. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 1941–1972.

MATHEWS K. O., TORIBIO J. A., NORRIS J. M., *et al.* *Coxiella burnetii* seroprevalence and Q fever in Australian wildlife rehabilitators. *One Health*, 12:100197, 2020.

MEADOWS S., JONES-BITTON A., MCEWEN S., *et al.* *Coxiella burnetii* seropositivity and associated risk factors in sheep in Ontario, Canada. *Prev Vet Med* ;122(1-2):129-134, 2015 (a)

MEADOWS S., JONES-BITTON A., MCEWEN S. *et al.* *Coxiella burnetii* seropositivity and associated risk factors in goats in Ontario, Canada. *Prev Vet Med.*;121(3-4):199-205, 2015 (b)

MENADI, S. E., CHISU, V., SANTUCCIU, C., *et al.* Serological, Molecular Prevalence and Genotyping of *Coxiella burnetii* in Dairy Cattle Herds in Northeastern Algeria. *Veterinary Sciences*, 9(2), 2022  
<https://doi.org/10.3390/vetsci9020040>

METTERS, G.; NORVILLE, I.H.; TITBALL, R.W.; HEMSLEY, C.M. From cell culture to cynomolgus macaque: Infection models show lineage-specific virulence potential of *Coxiella burnetii*. *J. Med. Microbiol.* 68, 1419–1430, 2019.

MEURER, I. R.; SILVA, M. R.; VANELLI, C. P. *et al.* Q Fever: characteristics and reports of an important neglected zoonosis in Brazil. Brazilian Journal of Health Review, v. 5, n. 2, p. 5450-5465, 2022. (a)

MEURER I. R., SILVA M. R., SILVA M. V. F., *et al.* Seroprevalence estimate and risk factors for *Coxiella burnetii* infections among humans in a highly urbanised Brazilian state. Trans R Soc Trop Med Hyg, 116(3):261-269, 2022. (b)

MINOR C., KERSH G. J., GELATT T., *et al.* *Coxiella burnetii* in northern fur seals and Steller sea lions of Alaska. J Wildl Dis. 49(2):441-446, 2013.

MIONI M.S. R., HENKER L. C., TEIXEIRA W. S. R., *et al.* Molecular detection of *Coxiella burnetii* in aborted bovine fetuses in Brazil. Acta Trop. 227:106258, 2022.

MIONI M. S. R., COSTA F. B., RIBEIRO B. L. D., *et al.* *Coxiella burnetii* in slaughterhouses in Brazil: A public health concern. PLoS One, 15(10):e0241246, 2020.

MIONI M. S. R., SIDI-BOUMEDINE K., MORALES DALANEZI F., *et al.* New Genotypes of *Coxiella burnetii* Circulating in Brazil and Argentina. Pathogens, 9(1):30, 2019 (a)

MIONI M. S. R., *et al.* Real-time quantitative PCR-based detection of *Coxiella burnetii* in unpasteurized cow's Milk sold for human consumption. Zoonoses Public Health, Sep;66(6):695-700, 2019 (b)

MIONI, M. S. R. Sorologia e detecção molecular de *Coxiella burnetii* em bovinos no estado de São Paulo, Brasil. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Botucatu, 2018.

MOHAMMAD M. O., GILBERT J. K. Prevalence and Risk Factors of *Coxiella burnetii* Antibodies in Bulk Milk from Cattle, Sheep, and Goats in Jordan. J Food Prot. 80(4): 561–566, 2017.

MUEMA J., NYAMAI M., WHEELHOUSE N., *et al.* Endemicity of *Coxiella burnetii* infection among people and their livestock in pastoral communities in northern Kenya. Heliyon, 8(10):e11133, 2022.

MUHAMMAD K. A., GADZAMA U. N., ONYICHE T. E. Distribution and Prevalence of *Coxiella burnetii* in Animals, Humans, and Ticks in Nigeria: A Systematic Review. Infect Dis Rep.;15(5):576-588, 2023.

NASCIMENTO C. F., DE MELLO V. V. C., MACHADO R. Z., *et al* Molecular Detection of *Coxiella burnetii* in Unstandardized Minas Artisanal Cheese Marketed in Southeastern Brazil. Acta Trop, 220:105942, 2021.

NUSINOVICI S., HOCH T., BRAHIM M. L., *et al.* The effect of wind on *Coxiella burnetii* transmission between cattle herds: a mechanistic approach. Transbound Emerg Dis, 2015 [https:// doi.org/10.1111/tbed.12423](https://doi.org/10.1111/tbed.12423)

OIE. Q fever. *OIE Terrestrial Manual*. pp. 1-13, 2010.

OLIVEIRA J. M. B., ROZENTAL T., DE LEMOS E. R. S., *et al.* *Coxiella burnetii* in dairy goats with a history of reproductive disorders in Brazil. Acta Trop, 183:19-22, 2018.

OLIVEIRA, T. M. S. PCR em tempo real: métodos e aplicações. Universidade de Aveiro. Departamento de Biologia. 2010.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DA SAÚDE. Mudança do clima para profissionais da saúde: Guia de bolso, Washington DC, 2021

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA (FAO). FAO apresenta avanços no combate às perdas e ao

desperdício de alimentos. 2017 Disponível em < <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/1062706/> > Acesso em 16 jun 2020.

ORR B., MALIK R., WESTMAN M. E., NORRIS J. M. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in pig-hunting dogs from north Queensland, Australia. *Aust Vet J*, 100(6):230-235, 2022.

OYSTON P. C. F., DAVIES C. Q fever: the neglected biothreat agent. *J Med Microbiol*, 60(1):9-21, 2011.

OZGEN E. K., KILICOGLU Y., YANMAZ B., *et al.* Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* detected in humans and domestic ruminants in Turkey. *Vet Microbiol*, 273:109519, 2022.

PACHECO, R. C., ECHAIDE, I. E., ALVES, R. N., *et al.* *Coxiella burnetii* in ticks, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, 19(2), 344–346, 2013.

PARKER N., ROBSON J., BELL M. A serosurvey of *Coxiella burnetii* infection in children and young adults in South West Queensland. *Aust N Z J Public Health*, 34(1):79-82, 2010.

PEARSON, T.; HORNSTRA, H. M.; HILSABECK, R.; *et al.* High prevalence and two dominant host-specific genotypes of *Coxiella burnetii* in U.S. milk. *BMC Microbiology*, v. 14, n. 41, 2014.

PORTER S. R., *et al.* Q Fever: current state of knowledge and perspectives of research of a neglected zoonosis. *Int J Microbiol*, 248418, 2011.

RABAZA A., FRAGA M., CORBELLINI L. G., *et al.* Molecular prevalence of *Coxiella burnetii* in bulk-tank milk from bovine dairy herds: Systematic review and meta-analysis. *One Health*. 12:100208, 2020.

RABAZA A., MACÍAS-RIOSECO M., FRAGA M., *et al.* *Coxiella burnetii* abortion in a dairy farm selling artisanal cheese directly to consumers and review of Q fever as a bovine abortifacient in South America and a human milk-borne disease. *Braz J Microbiol*; 52(4):2511-2520, 2021.

RAHRAVANI M., MORAVEDJI M., MOSTAFAVI E., *et al.* The epidemiological survey of *Coxiella burnetii* in small ruminants and their ticks in western Iran. *BMC Vet Res*, 18(1):292, 2022

RAMATLA T., KHUMALO Z. T. H., MATSHOTSHI A. Molecular detection of *Coxiella burnetii* and *Coxiella* species in rats and chickens from poultry farms in North West Province, South Africa. *Vet Med Sci*, 9(5):2185-2191, 2023.

RIBEIRO-NETTO A. ,NIKITIN T. , RIBEIRO I. F. Estudo sobre febre Q em São Paulo: Prevalência em ordenhadores e tratadores de bovinos. *Rev Inst Med Trop*, 6(6):255-257, 1964.

RIEMANN H. P., *et al.* *Toxoplasma gondii* and *Coxiella burnetii* antibodies among Brazilian slaughterhouse employees. *Amer J Epidemiol*, 102(5):386-393, 1975.

ROEST, H.I., *et al.* Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* from ruminants in Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerg Infect. Dis.* 17, 668–675, 2011.

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>>

ROZENTAL T., FARIA L. S., FORNEAS D., *et al.* First molecular detection of *Coxiella burnetii* in Brazilian artisanal cheese: a neglected food safety hazard in ready-to-eat raw-milk product. *Braz J Infect Dis.* May-Jun;24(3):208-212, 2020.

ROZENTAL T., FERREIRA M.S., GUTERRES A. *et al.* Zoonotic pathogens in atlantic forest wild rodents in Brazil: bartonella and *Coxiella* infections. *Acta Trop.* 2017; 168:64–73. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.01.003.

ROZENTAL T., SILVA A. S. V. D., OLIVEIRA R. C., *et al.* Seroprevalence of *Bartonella* spp., *Coxiella burnetii*, and *Hantavirus* among people who inject drugs in Rio de Janeiro, Brazil: a retrospective assessment of a biobank. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 60:e31, 2018.

ROZENTAL T., *et al.* *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever in Brazil: its hidden role in seronegative arthritis and the importance of molecular diagnosis based on the repetitive element IS1111 associated with the transposase gene. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 107(5):695- 697, 2012.

SANTOS A.S., BACELLAR F., FRANÇA A. Febre Q: revisão de conceitos. *Rev Soc Port de Med Inter*, 14(2):90-99, 2007.

SCHETS F. M., *et al.* *Coxiella burnetii* in sewage water at treatment plants in a Q fever epidemic area. *Int J Hyg Environ Health*, Nov; 216(6):698-702, 2013.

SCHIMMER, B., *et al.* The use of a geographic information system to identify a dairy goat farm as the most likely source of an urban Q fever outbreak. *BMC Infect. Dis*, 2010.

SCHIMMER, B., *et al.* Low seroprevalence of Q fever in The Netherlands prior to a series of large outbreaks. *Epidemiol. Infect.* 140, 27–35, 2012.

SEIMENIS A. M. The spread of zoonoses and other infectious diseases through the international trade of animals and animal products. *Vet Ital.* 44:591-9, 2008.

SELIM A., MARAWAN M. A., ABDELHADY A., *et al.* *Coxiella burnetii* and its risk factors in cattle in Egypt: a seroepidemiological survey. *BMC Vet Res*, 19(1):29, 2023

SELIM A., ABDELRAHMAN A., THIÉRY R., SIDI-BOUMEDINE K. Molecular typing of *Coxiella burnetii* from sheep in Egypt. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* Dec;67:101353, 2019.

SELLENS E., BOSWARD K. L., NORRIS J. M., *et al.* *Coxiella burnetii* seroprevalence in unvaccinated veterinary workers in Australia: Evidence to support Q fever vaccination. *Zoonoses Public Health*, 67(1):79-88, 2020.

SEO M. G., OUH I. O., KWAK D. Herd prevalence and genotypes of *Coxiella burnetii* in dairy cattle bulk tank milk in Gyeongsang provinces of South Korea. *Trop Anim Health Prod*, 50(6):1399-1404, 2018.

SEO M. G., OUH I. O., LEE S. H., KWAK D. Detection and Genotyping of *Coxiella burnetii* in Pigs, South Korea, 2014-2015. *Emerg Infect Dis*, 22(12):2192-2195, 2016 (a)

SEO M. G., LEE S. H., VANBIK D., *et al.* Detection and Genotyping of *Coxiella burnetii* and *Coxiella*-Like Bacteria in Horses in South Korea. *PLoS One*. 11(5):e0156710, 2016 (b)

SESHADRI R., PAULSEN I. T., EISEN J. A., *et al.* Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(9):5455-5460, 2003.

SHAW E. I., VOTH D. E. *Coxiella burnetii*: A Pathogenic Intracellular Acidophile. *Microbiology (Reading)* 165(1):1-3, 2019

SHAPIRO A. J., NORRIS J. M., HELLER J. *et al.* Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in Australian dogs. *Zoonoses Public Health*, 63(6):458-466, 2016.

SHAPIRO A. J., BOSWARD K. L., HELLER J., NORRIS J. M. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in domesticated and feral cats in eastern Australia. *Vet Microbiol*, 177(1-2):154-161, 2015.

SICILIANO R. F., CASTELLI J. B., MANSUR A. J., *et al.* *Bartonella* spp. and *Coxiella burnetii* Associated with Community-Acquired, Culture-Negative Endocarditis, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 21(8):1429-1432, 2015.

SIDI-BOUMEDINE, *et al.* Development of harmonized schemes for the monitoring and reporting of Q-fever in animals in the European Union. *EFSA Support. Publ.* 7, 2010.

SILVA, R. O. P. e. Panorama do Mercado de Leite em 2023. Análises e Indicadores do Agronegócio, São Paulo, v. 18, n. 8, p. 1-7, ago. 2023. Disponível em: <http://www.iea.agricultura.sp.gov.br/out/TerTexto.php?codTexto=16156> Acesso em 06/01/2024.

SOMMA-MOREIRA R. E., CAFFARENA R. M., SOMMA S., *et al.* Analysis of Q fever in Uruguay. *Rev Infect Dis*, 9(2):386-387, 1987.

SOUZA E. A. R., CASTRO E. M. S., OLIVEIRA G. M. B., *et al.* Serological diagnosis and risk factors for *Coxiella burnetii* in goats and sheep in a semi-arid region of Northeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, 27(4):514-520, 2018.

SZYMAŃSKA-CZERWIŃSKA M., JODEŁKO A., ZARĘBA-MARCHEWKA K., NIEMCZUK K. Shedding and genetic diversity of *Coxiella burnetii* in Polish dairy cattle. *PLoS One*, 14(1):e0210244, 2019.

SZYMAŃSKA-CZERWIŃSKA M., JODEŁKO A., PLUTA M., KOWALIK S., NIEMCZUK K. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* among domestic ruminants and horses in Poland. *Acta Virol.* 61(3):369-371, 2017.

TISSOT-DUPONT H., RAOULT D. Q fever. *Infect Dis Clin North Am*, 22(3): 505–514, 2008.

TOKAREVICH N. K., PANFEROVA Y. A., FREYLIKHMAN O. A., *et al.* *Coxiella burnetii* in ticks and wild birds. *Ticks Tick Borne Dis*, 10(2):377-385, 2019.

TOMAIUOLO S., BOARBI S., FANCELLO T., *et al.* Phylogeography of human and animal *Coxiella burnetii* strains: genetic fingerprinting of Q fever in Belgium. *Front Cell Infect Microbiol*. 10:625576, 2021.

TRUJILLO M., CONAN A., CALCHI A. C., *et al.* *Coxiella burnetii* shedding and serological status in pregnant and postpartum ewes. *Acta Trop*; 244:106962, 2023

VAIDYA V. M., MALIK S. V., BHILEGAONKAR K. N. Prevalence of Q fever in domestic animals with reproductive disorders. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2010;33(4):307-321. doi:10.1016/j.cimid.2008.10.006

VAN DEN BROM R., VAN ENGELEN E., ROEST H. I. J. *et al.* *Coxiella burnetii* infections in sheep or goats: an opinionated review. *Vet Microbiol* 181:119–129, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.011>.

VARELA-CASTRO L., ZUDDAS C., ORTEGA N., *et al.* On the possible role of ticks in the eco-epidemiology of *Coxiella burnetii* in a Mediterranean ecosystem. *Ticks Tick Borne Dis* 2018; 9(3): 687-694. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.02.014> PMID:29478883.  
» <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.02.014>

VOSS L., HUAMAN J., PACIONI C., *et al.* Seroprevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in wild deer populations in eastern Australia. *Aust Vet J*, 101(3):106-114, 2023

WHELAN J., *et al.* Visits on 'lamb-viewing days' at a sheep farm open to the public was a risk factor for Q fever in 2009. *Epidemiol Infect*, 140:858–864, 2012.

WHITNEY E. A. S., *et al.* Seroepidemiologic and Occupational Risk Survey for *Coxiella burnetii* Antibodies among US Veterinarians. *Clin Infect Dis*, 48(5):550-557, 2009.

World Organization for Animal Health (OIE) - (2018) OIE Terrestrial Manual – Q fever (3) 560-577. Retrieved from: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.01.16\\_Q\\_FEVER.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.16_Q_FEVER.pdf)

YADAV J. P., MALIK S. V. S., DHAKA P., *et al.* *Coxiella burnetii* in cattle and their human contacts in a gaushala (cattle shelter) from India and its partial *com1* gene sequence-based phylogenetic analysis. *Anim Biotechnol*, 33(7):1449-1458, 2022.

YESSINOU R. E., KATJA M. S., HEINRICH N., *et al.* Prevalence of *Coxiella*-infections in ticks - review and meta-analysis. *Ticks Tick Borne Dis*, 13(3):101926, 2022.

# *Apêndices*

**APÊNDICE A** - Quantificação do DNA das amostras de leite bovino em Nanodrop  
(ng/μL)

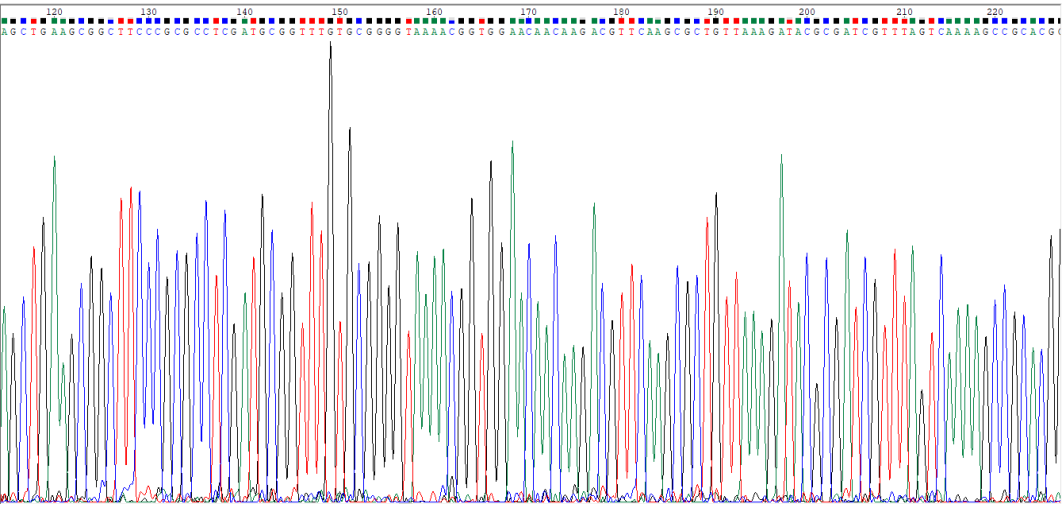
| AMOSTRAS | RELAÇÃO 260/280 | DNA AMOSTRA (ng/μL) |
|----------|-----------------|---------------------|
| 1        | 2.027           | 8.1                 |
| 2        | 2.060           | 15.6                |
| 3        | 1.882           | 17.5                |
| 4        | 2.234           | 15.3                |
| 5        | 2.037           | 12.6                |
| 6        | 2.148           | 16.0                |
| 7        | 2.030           | 12.1                |
| 8        | 2.036           | 17.0                |
| 9        | 2.080           | 7.6                 |
| 10       | 2.060           | 20.5                |
| 11       | 1.900           | 13.3                |
| 12       | 1.963           | 26.5                |
| 13       | 2.368           | 10.3                |
| 14       | 2.289           | 9.5                 |
| 15       | 2.215           | 13.4                |
| 16       | 2.185           | 16.5                |
| 17       | 2.152           | 17.0                |
| 18       | 2.171           | 16.5                |
| 19       | 2.080           | 14.3                |
| 20       | 2.176           | 18.5                |
| 21       | 2.020           | 14.9                |
| 22       | 2.036           | 17.0                |
| 23       | 2.242           | 18.5                |
| 24       | 2.090           | 18.5                |
| 25       | 2.256           | 22.0                |
| 26       | 2.374           | 16.5                |
| 27       | 2.379           | 16.6                |
| 28       | 2.143           | 21.0                |
| 29       | 1.841           | 121.0               |
| 30       | 2.312           | 18.5                |
| 31       | 2.051           | 6.0                 |
| 32       | 2.404           | 5.7                 |
| 33       | 1.980           | 4.9                 |
| 34       | 2.011           | 18.0                |
| 35       | 1.648           | 21.5                |
| 36       | 2.222           | 17.0                |
| 37       | 1.809           | 18.0                |
| 38       | 1.727           | 21.5                |
| 39       | 1.600           | 76.00               |

|    |       |       |
|----|-------|-------|
| 40 | 2.020 | 20.0  |
| 41 | 1.860 | 15.9  |
| 42 | 1.457 | 102.0 |
| 43 | 2.112 | 8.5   |
| 44 | 1.965 | 11.3  |
| 45 | 2.571 | 7.2   |
| 46 | 1.632 | 6.2   |
| 47 | 1.534 | 56.0  |
| 48 | 2.143 | 12.8  |
| 49 | 2.539 | 11.3  |
| 50 | 2.059 | 13.1  |
| 51 | 2.268 | 9.3   |
| 52 | 1.898 | 28.0  |
| 53 | 2.062 | 26.5  |
| 54 | 2.124 | 27.5  |
| 55 | 1.835 | 25.5  |
| 56 | 1.485 | 50.5  |
| 57 | 2.147 | 24.5  |
| 58 | 2.168 | 22.0  |
| 59 | 1.712 | 31.5  |
| 60 | 2.204 | 20.5  |
| 61 | 2.018 | 22.5  |
| 62 | 1.905 | 20.0  |
| 63 | 1.866 | 10.5  |
| 64 | 1.986 | 14.4  |
| 65 | 2.071 | 8.8   |
| 66 | 1.984 | 12.6  |
| 67 | 1.553 | 8.0   |
| 68 | 2.229 | 7.8   |
| 69 | 2.246 | 6.9   |
| 70 | 2.012 | 8.2   |
| 71 | 1.955 | 8.6   |
| 72 | 1.783 | 8.2   |
| 73 | 1.571 | 9.4   |
| 74 | 1.804 | 18.0  |
| 75 | 1.499 | 8.5   |
| 76 | 1.892 | 7.7   |
| 77 | 1.664 | 9.4   |
| 78 | 1.676 | 8.8   |
| 79 | 1.569 | 9.1   |
| 80 | 1.773 | 9.8   |
| 81 | 1.469 | 9.4   |
| 82 | 1.811 | 10.1  |
| 83 | 1.720 | 13.5  |
| 84 | 1.756 | 18.0  |
| 85 | 1.903 | 12.1  |
| 86 | 1.716 | 15.6  |
| 87 | 1.678 | 12.4  |

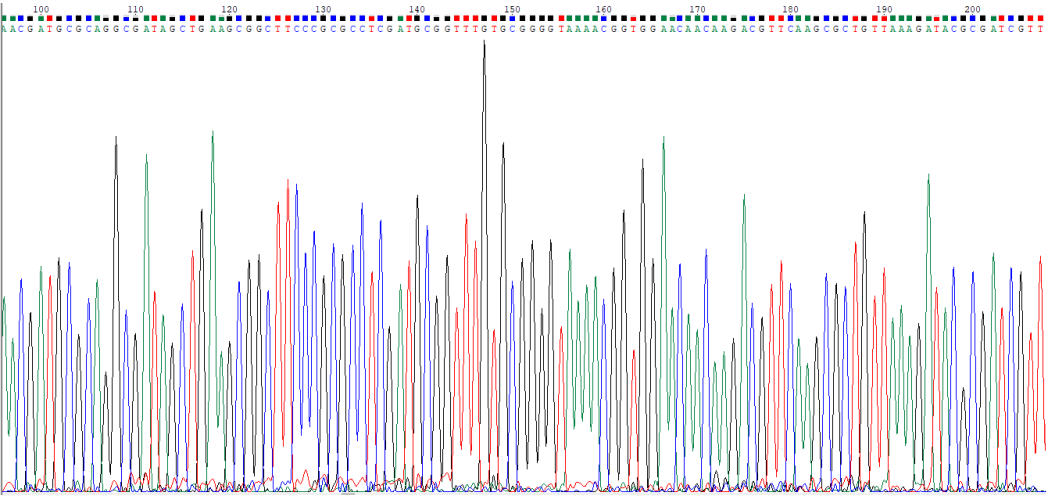
|            |       |      |
|------------|-------|------|
| <b>88</b>  | 1.974 | 8.8  |
| <b>89</b>  | 1.769 | 12.5 |
| <b>90</b>  | 1.597 | 12.7 |
| <b>91</b>  | 1.879 | 11.7 |
| <b>92</b>  | 1.204 | 5.6  |
| <b>93</b>  | 1.880 | 4.7  |
| <b>94</b>  | 2.054 | 5.8  |
| <b>95</b>  | 1.916 | 12.6 |
| <b>96</b>  | 1.831 | 5.4  |
| <b>97</b>  | 1.447 | 7.4  |
| <b>98</b>  | 1.643 | 92.0 |
| <b>99</b>  | 1.707 | 9.9  |
| <b>100</b> | 1.694 | 9.4  |
| <b>101</b> | 1.851 | 9.4  |
| <b>102</b> | 1.873 | 5.9  |

**APÊNDICE B - Eletroferogramas gerados no programa Chromas 2.6.6**

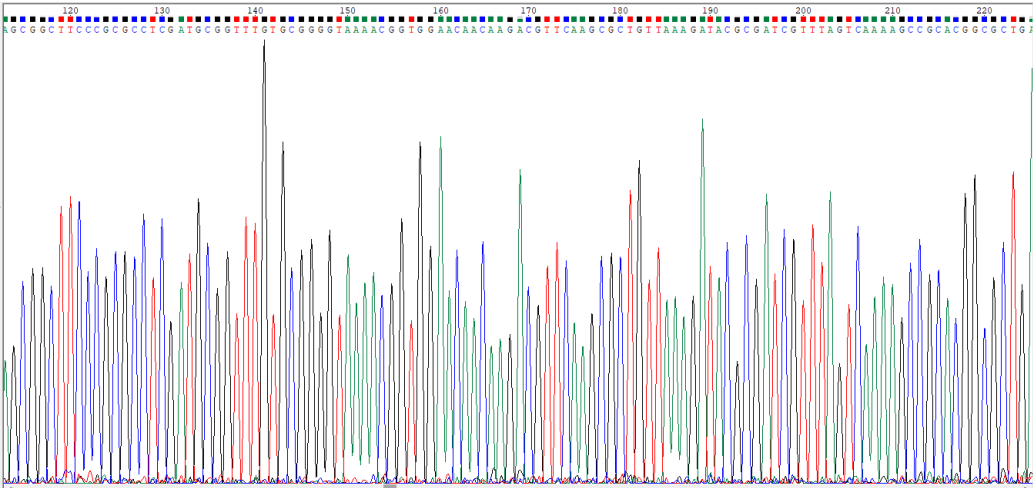
**Eletroferograma amostra 35**



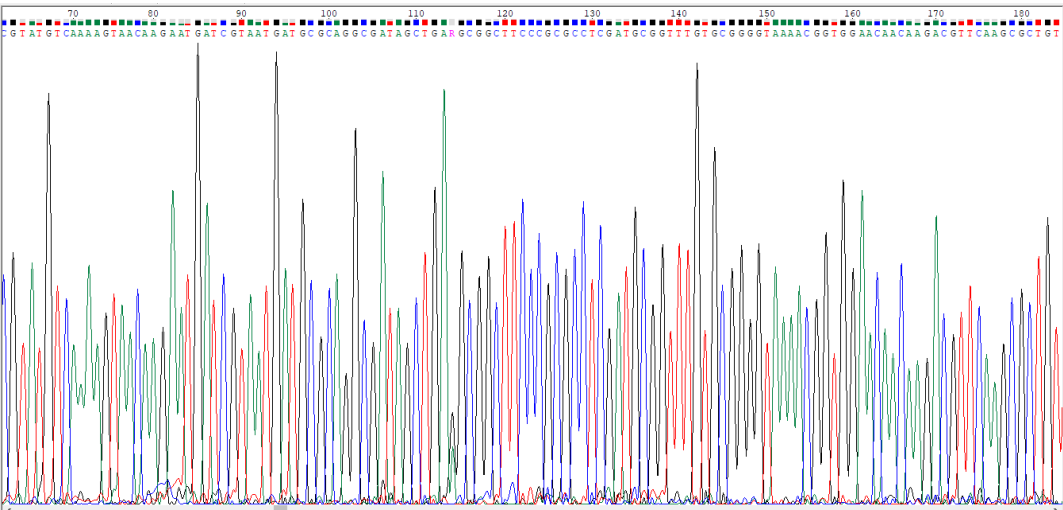
**Eletroferograma amostra 37**



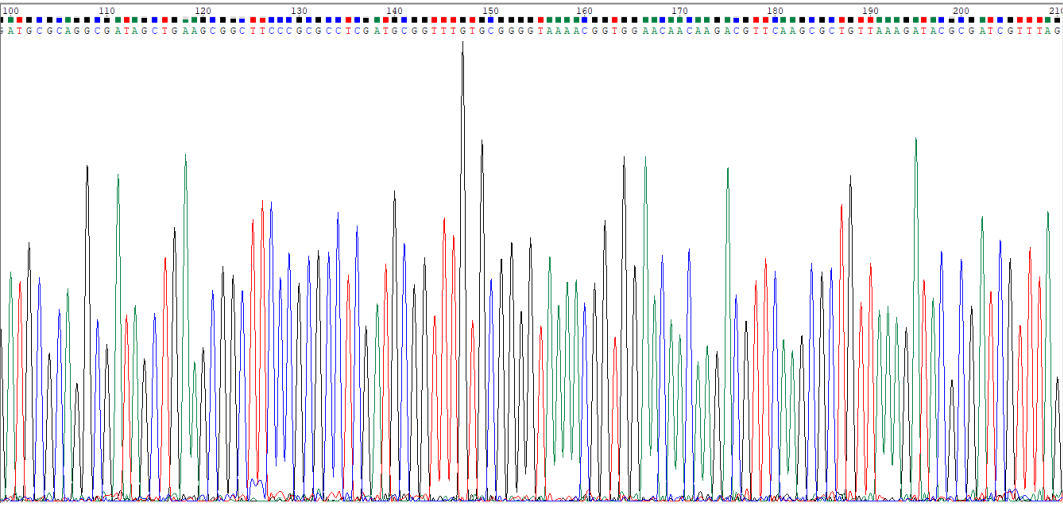
**Eletroferograma amostra 38**



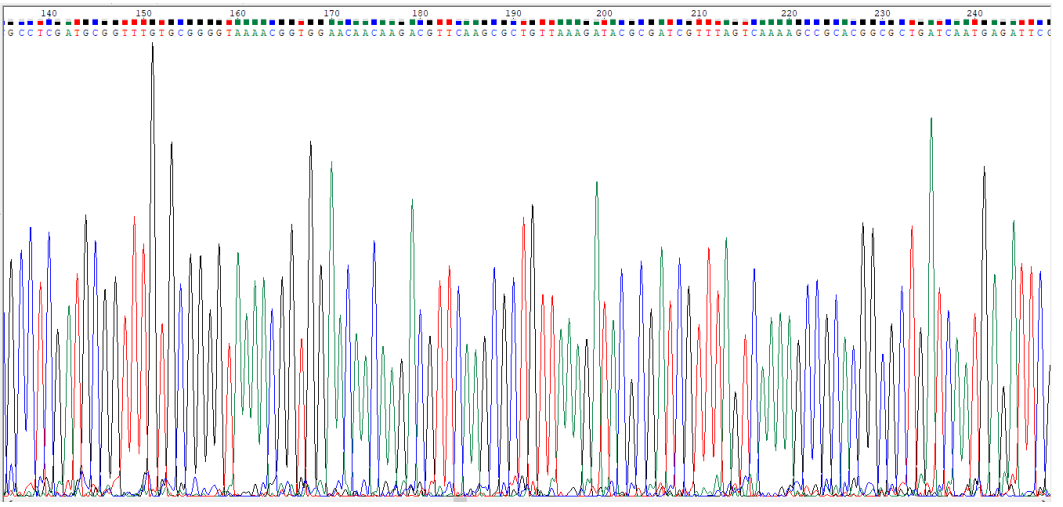
**Eletroferograma amostra 43**



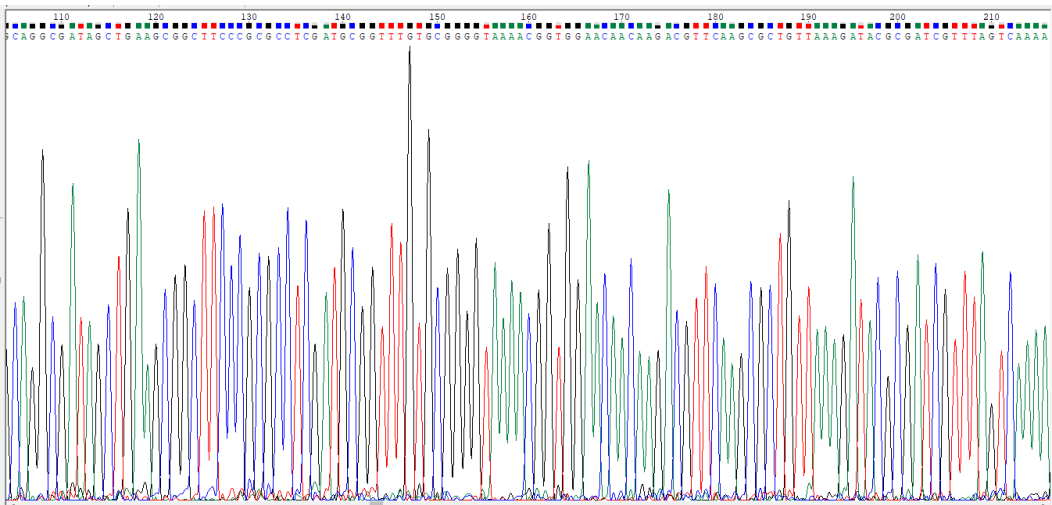
**Eletroferograma amostra 44**



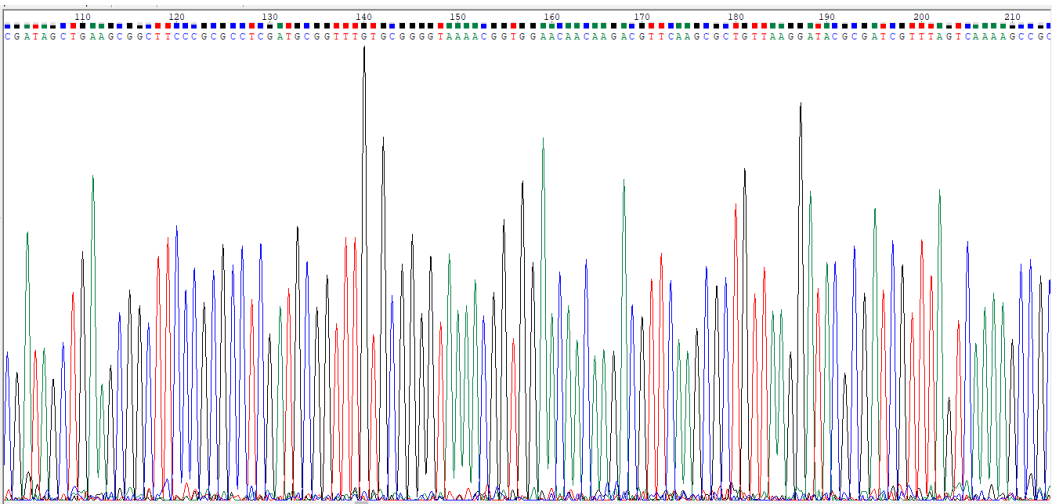
**Eletroferograma amostra 49**



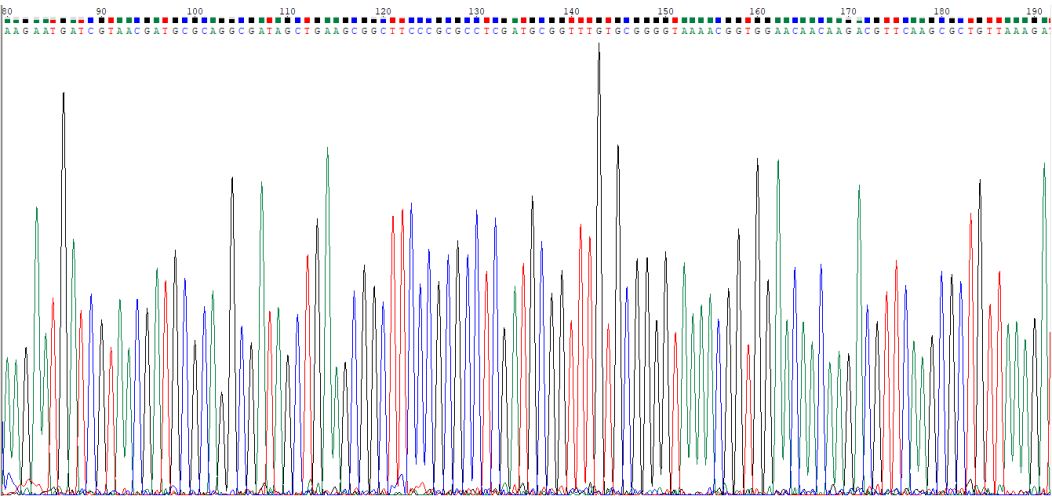
**Eletroferograma amostra 52**



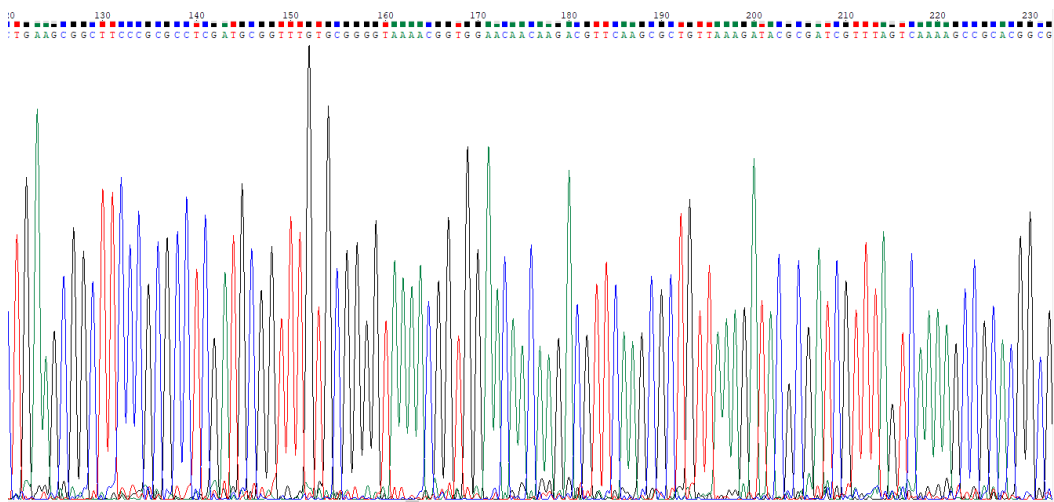
**Eletroferograma amostra 59**



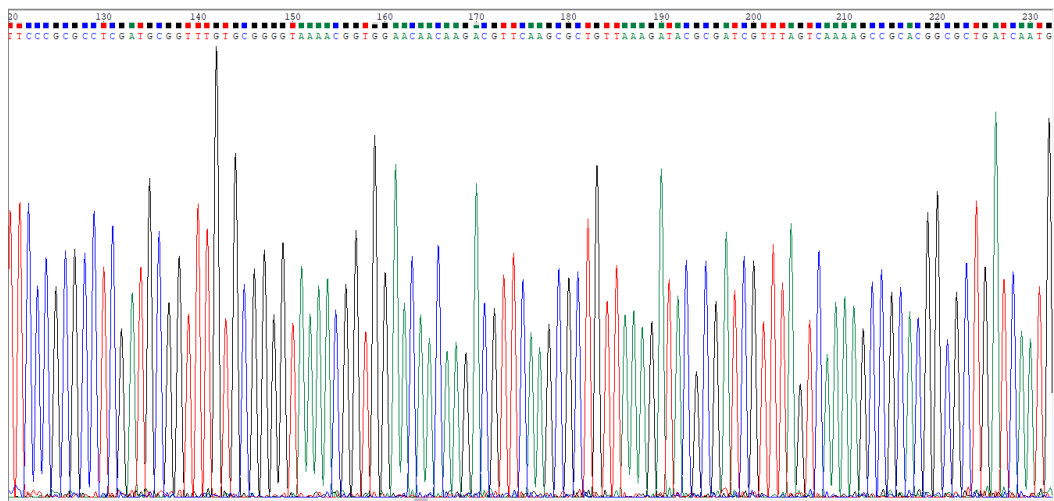
**Eletroferograma amostra 60**



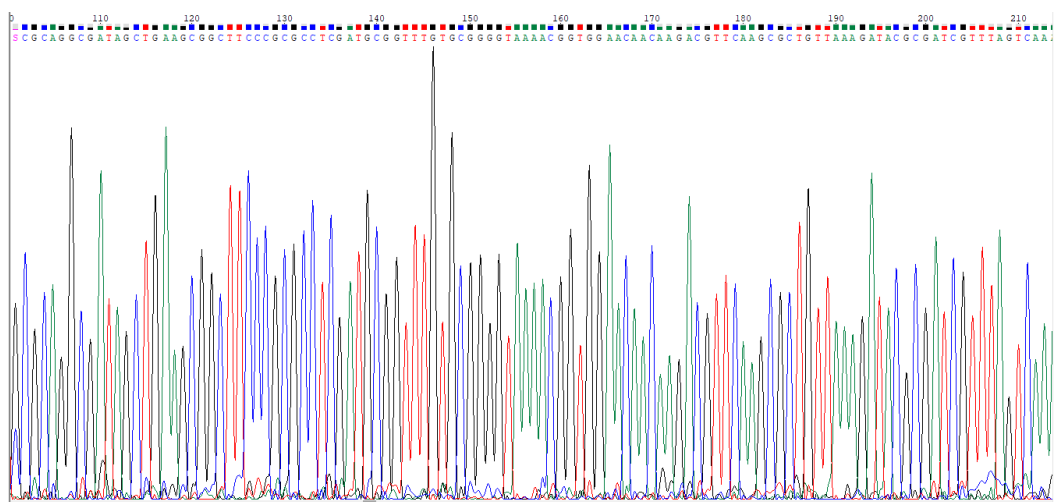
**Eletroferograma amostra 62**



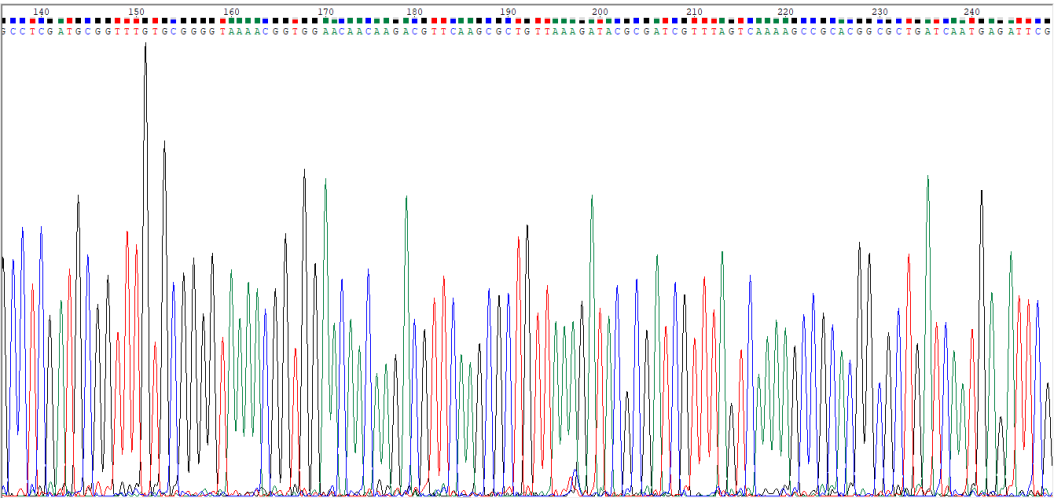
**Eletroferograma amostra 64**



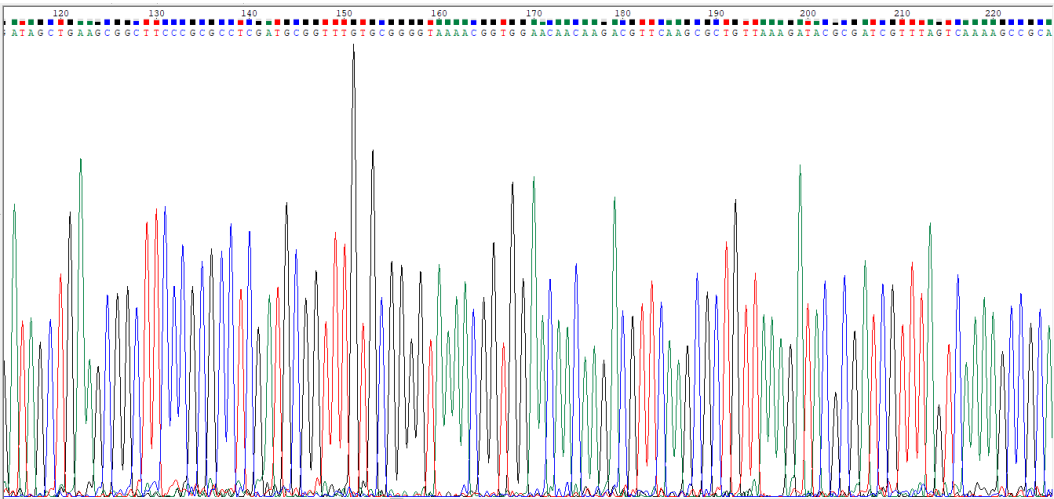
**Eletroferograma amostra 66**



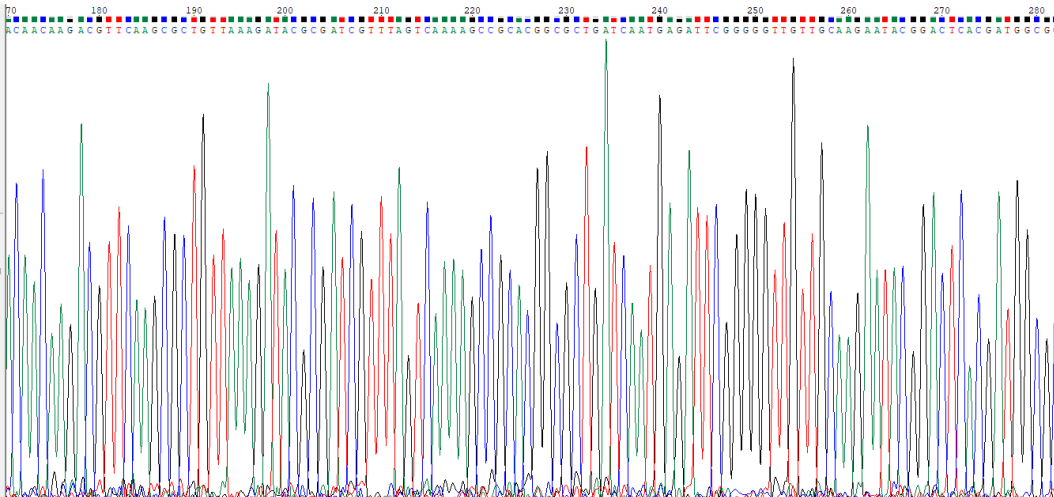
**Eletroferograma amostra 71**



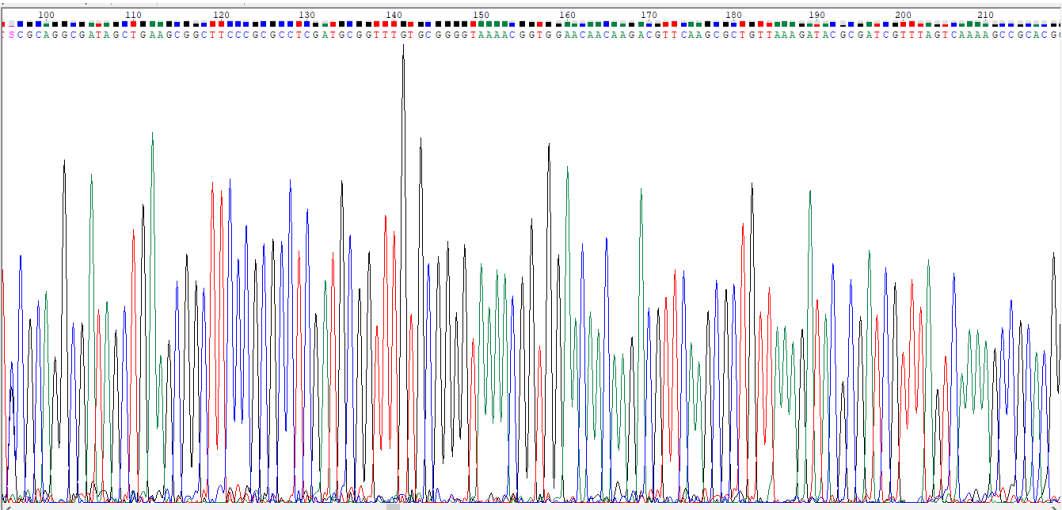
**Eletroferograma amostra 74**



**Eletroferograma amostra 93**



Eletroferograma amostra 100



**Apêndice C** – Resultados de detecção de *Coxiella burnetti* em amostras de leite bovino para cada técnica diagnóstica utilizada – Nested-PCR, qPCR Syber e qPCR sonda

| Nº Amostra | Nested-PCR      | qPCR Sybr       | qPCR Sonda      | Município |
|------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------|
| 1          | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 2          | Negativa        | Negativa        | <b>Positiva</b> | Avaré     |
| 3          | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 4          | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 5          | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 6          | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 7          | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 8          | Negativa        | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | Avaré     |
| 9          | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 10         | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 11         | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 12         | Negativa        | Negativa        | <b>Positiva</b> | Avaré     |
| 13         | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 14         | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 15         | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 16         | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 17         | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 18         | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 19         | Negativa        | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | Avaré     |
| 20         | Negativa        | Negativa        | <b>Positiva</b> | Avaré     |
| 21         | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 22         | Negativa        | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | Avaré     |
| 23         | Negativa        | Negativa        | <b>Positiva</b> | Avaré     |
| 24         | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 25         | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 26         | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 27         | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 28         | Negativa        | Negativa        | <b>Positiva</b> | Avaré     |
| 29         | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 30         | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 31         | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 32         | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 33         | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 34         | Negativa        | Negativa        | <b>Positiva</b> | Avaré     |
| 35         | <b>Positiva</b> | Negativa        | <b>Positiva</b> | Avaré     |
| 36         | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 37         | <b>Positiva</b> | Negativa        | <b>Positiva</b> | Avaré     |
| 38         | <b>Positiva</b> | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 39         | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 40         | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 41         | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |
| 42         | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré     |

|    |                 |                 |                 |                 |
|----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 43 | <b>Positiva</b> | Negativa        | Negativa        | Avaré           |
| 44 | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | Avaré           |
| 45 | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré           |
| 46 | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré           |
| 47 | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Avaré           |
| 48 | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Cerqueira César |
| 49 | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | Cerqueira César |
| 50 | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Cerqueira César |
| 51 | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Cerqueira César |
| 52 | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | Cerqueira César |
| 53 | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Cerqueira César |
| 54 | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Cerqueira César |
| 55 | Negativa        | Negativa        | <b>Positiva</b> | Cerqueira César |
| 56 | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Cerqueira César |
| 57 | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Cerqueira César |
| 58 | Negativa        | Negativa        | <b>Positiva</b> | Arandu          |
| 59 | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | Negativa        | Arandu          |
| 60 | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | Arandu          |
| 61 | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Arandu          |
| 62 | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | Bofete          |
| 63 | Negativa        | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | Bofete          |
| 64 | <b>Positiva</b> | Negativa        | <b>Positiva</b> | Bofete          |
| 65 | Negativa        | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | Bofete          |
| 66 | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | Bofete          |
| 67 | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Bofete          |
| 68 | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Bofete          |
| 69 | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Pardinho        |
| 70 | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Pardinho        |
| 71 | <b>Positiva</b> | Negativa        | Negativa        | Pardinho        |
| 72 | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Pardinho        |
| 73 | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Pardinho        |
| 74 | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | Pardinho        |
| 75 | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Pardinho        |
| 76 | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Pardinho        |
| 77 | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Pardinho        |
| 78 | Negativa        | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | Pardinho        |
| 79 | Negativa        | Negativa        | <b>Positiva</b> | Pardinho        |
| 80 | Negativa        | <b>Positiva</b> | Negativa        | Pardinho        |
| 81 | Negativa        | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | Pardinho        |
| 82 | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Pardinho        |
| 83 | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Pardinho        |
| 84 | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Pardinho        |
| 85 | Negativa        | <b>Positiva</b> | Negativa        | Anhembi         |
| 86 | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Anhembi         |
| 87 | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Anhembi         |
| 88 | Negativa        | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | Anhembi         |

|     |                 |                 |                 |          |
|-----|-----------------|-----------------|-----------------|----------|
| 89  | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Anhembi  |
| 90  | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Anhembi  |
| 91  | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Anhembi  |
| 92  | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Anhembi  |
| 93  | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | Anhembi  |
| 94  | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Anhembi  |
| 95  | Negativa        | Negativa        | <b>Positiva</b> | Anhembi  |
| 96  | Negativa        | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | Anhembi  |
| 97  | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Anhembi  |
| 98  | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Botucatu |
| 99  | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Botucatu |
| 100 | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | Bauru    |
| 101 | Negativa        | <b>Positiva</b> | <b>Positiva</b> | Bauru    |
| 102 | Negativa        | Negativa        | Negativa        | Bauru    |

*Anexos*

ANEXO A – Certificado de aceite do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE BOTUCATU  
FACULDADE DE MEDICINA



**CERTIFICADO Nº 1369/2020 – CEUA**

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

Certificamos que o projeto intitulado: **"Diagnóstico molecular para Coxiella Burnetii em leite bovino coletado de tanques de refrigeração de pequenas propriedades e análise espacial"**, Conduzido pela Pesquisadora: **Thainá Valente Bertozzo** – Orientador: Profa. Dra. Simone Baldini Luchesi – Coorientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Merino de Medeiros, registrada com o nº **CEUA 1369/2020**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião ordinária de 26 de agosto de 2020.

|                         |                                    |
|-------------------------|------------------------------------|
| Finalidade              | ( ) Ensino (X) Pesquisa Científica |
| Vigência da autorização | 31/08/2022                         |
| Especie/Linhagem/Raça   | Amstras de Leite                   |
| Nº de animais           | ZERO                               |
| Idade/Peso              | -----                              |
| Origem                  | CEUA 51/2016 FMVZ                  |



Sara Rosa Stanley Sampaio  
Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP



Profa. Associada Bertha Furlan Polegato  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Distrito Rubião Júnior, s/nº – Botucatu – SP. CEP: 18.618-970 Fones: (14) 3880.1880 – E-mail Secretária: ceua@fmb.unesp.br