

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E**  
**DERIVADOS**

**Léticia Scafutto de Faria**

**PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO PARA *Coxiella burnetii* EM QUEIJOS**  
**MINAS ARTESANAIS DA MICRORREGIÃO DO SERRO**

**Juiz de Fora**

**2017**

**Leticia Scafutto de Faria**

**PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO PARA *Coxiella burnetii* EM QUEIJOS  
MINAS ARTESANAIS DA MICRORREGIÃO DO SERRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Roberto Silva  
Co-orientadores: Prof. Dr. João Batista Ribeiro  
                          Profa. Dra Elba Regina Sampaio de Lemos

**Juiz de Fora**

**2017**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Faria, Leticia Scafutto de.

PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO PARA *Coxiella burnetii* EM QUEIJOS MINAS ARTESANAIS DA MICRORREGIÃO DO SERRO / Leticia Scafutto de Faria. -- 2017.

67 p.

Orientador: Marcio Roberto Silva

Coorientadores: João Batista Ribeiro, Elba Regina Sampaio de Lemos

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2017.

1. *Coxiella burnetii*. 2. Queijo Minas Artesanal. 3. Febre Q. 4. Zoonose. 5. Alimento seguro. I. Silva, Marcio Roberto, orient. II. Ribeiro, João Batista, coorient. III. de Lemos, Elba Regina Sampaio, coorient. IV. Título.

**PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO PARA *Coxiella burnetii*  
EM QUEIJO MINAS ARTESANAL DA MICRORREGIÃO DO  
SERRO**

**Letícia Scafutto de Faria**

**ORIENTADOR (A): Marcio Roberto Silva**

Dissertação de Mestrado submetida ao Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Aprovada em 22/08/2017



---

Elba Regina Sampaio de Lemos



---

Liliane Denize Miranda Menezes



---

João Batista Ribeiro



---

Guilherme Nunes de Souza



---

Marcio Roberto Silva

Aos meus pais, **Marcio e Maria Luíza**, por serem meus maiores exemplos, ao meu esposo, **Pablo**, por todo amor, companheirismo e apoio e, em especial, a minha filha, **Helena**, por ser a razão e a luz da minha vida.

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu marido **Pablo** pelo amor, pelo apoio em todos os momentos e por fazer do meu sonho o seu sonho. Sem você essa conquista não seria possível.

Aos meus pais, **Marcio e Maria Luiza**, por sempre acreditarem em mim e por serem meus maiores exemplos.

À minha filha, **Helena**, por todos os momentos de alegria e por me tornar mais forte.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Marcio Roberto Silva**, pesquisador da Embrapa Gado de Leite, pela confiança, paciência, amizade, conselhos e orientação durante toda caminhada.

Aos professores da **Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)**, da **Embrapa Gado de Leite** e do **Instituto de Laticínios Cândido Tostes** pelos ensinamentos passados.

À **Embrapa Gado de Leite** por viabilizar financeiramente e tecnicamente minha formação acadêmica (mestrado).

À **Universidade Federal de Juiz de Fora** pela concessão da bolsa de monitoria para que eu pudesse me dedicar integralmente ao mestrado.

A toda **equipe do Laboratório de Hantavirose e Rickettsioses da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)** pela dedicação e compromisso na realização das análises laboratoriais, contribuindo para o desenvolvimento desse estudo.

A todos os colegas de mestrado, em especial ao **André** e ao **Rômulo** pela dedicação a esse projeto.

Aos **produtores rurais** que se dispuseram a participar desse estudo.

Aos componentes da **banca examinadora**, por se dispuserem a contribuir intelectualmente para o desenvolvimento desse trabalho.

A todos que contribuíram para a realização desse sonho, meu muito obrigada!

## RESUMO

O objetivo desse trabalho foi estimar a prevalência de *Coxiella burnetii* em Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro e identificar os fatores associados à presença desse microrganismo nas propriedades estudadas. Foram sorteados aleatoriamente 55 produtores cadastrados no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) para participar da pesquisa. Os produtores responderam a um questionário e foi coletada uma amostra de queijo de cada propriedade para representá-la. Nas amostras de queijo coletadas, foram realizadas as análises de Reação de Cadeia da Polimerase (PCR) para *C. burnetii* e sequenciamento dos produtos de DNA amplificados. Os dados provenientes das entrevistas e resultados das análises laboratoriais, uma vez sistematizados, formaram a base de dados do trabalho. A presença de DNA de *C. burnetii* foi considerada a variável dependente e as variáveis explicativas foram divididas em três grupos hierárquicos: distal (socioeconômicas e demográficas), intermediário (produção de queijo) e proximal (características do rebanho, produção de leite e ordenha). Os fatores associados à presença de *C. burnetii* nos queijos foram identificados por análises de regressão logística univariada e multivariada. Do total de amostras analisadas (n = 53), cinco (9,43%) apresentaram DNA de *C. burnetii* confirmado por sequenciamento. Os fatores associados com a presença de DNA de *C. burnetii* nos queijos foram: uso do pingo (soro-fermento) para a fabricação dos queijos (OR= 12,09), tipo de ordenha (OR= 16,45) e número de vacas em lactação (OR= 1,05). As variáveis que permaneceram no modelo final como explicativas para presença de *C. burnetii* nos queijos foram: número de vacas em lactação, tipo de ordenha e uso do pingo. A presença de DNA de *C. burnetii* nos queijos artesanais enfatiza, por um lado, a necessidade de medidas de controle mais rigorosas para que essa bactéria não esteja presente nos rebanhos de propriedades produtoras de queijos artesanais. Por outro lado, o conhecimento dos fatores associados à presença de *C. burnetii* nos queijos artesanais poderá auxiliar no estabelecimento de medidas preventivas e na criação de novas normas e legislação para a produção de queijos artesanais, já que essa lacuna na legislação seria algo para reflexão, dada a importância da febre Q para a saúde pública.

Palavras-chave: *Coxiella burnetii*. Febre Q. Zoonose. Queijo Minas Artesanal. Segurança do alimento



## ABSTRACT

The objective of this study was to estimate the prevalence of *Coxiella burnetii* in Artisan Minas cheese of region of Serro and identify the factors associated with the presence of this organism in the properties studied. Were drawn at random 55 registered producers in the Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) to participate in the research. The producers responded to a questionnaire and was collected a sample of cheese at a property to represent her. The cheese samples collected, the analysis of reaction of polymerase chain reaction (PCR) to *C. burnetii* and sequencing of amplified DNA products. Data from the interviews and results of laboratory tests, once organized, form the basis of work data. The presence of DNA of *C. burnetii* was considered as the dependent variable and the explanatory variables were divided into three groups: hierarchical distal (socioeconomic and demographic), intermediate (cheese production) and proximally (characteristics of the herd, milk production and milk). The factors associated with the presence of *C. burnetii* in cheeses were identified by analysis of univariate and multivariate logistic regression. Of the total samples analyzed (n = 53), five (9.43%) presented DNA of *C. burnetii* confirmed by sequencing. The factors associated with the presence of DNA of *C. burnetii* in cheeses were: use of the pingo (serum-baking) for the manufacture of the cheeses (OR = 12.09), type of milking (OR = (16.45) and number of lactating cows (OR = 1.05). The variables that remained in the final model as explanatory for the presence of *C. burnetii* in cheeses were: number of lactating cows, milking and type use the pingo. The presence of DNA of *C. burnetii* in artisanal cheeses emphasizes, on the one hand, the need for more stringent control measures so that this bacteria is not present in flocks of artisanal cheese-producing properties. On the other hand, the knowledge of the factors associated with the presence of *C. burnetii* in artisanal cheeses may assist in establishing preventive measures and the creation of new standards and legislation for the production of artisanal cheeses, since this gap in the legislation would be something for reflection, given the importance of Q fever to public health.

Keywords: *Coxiella burnetii*. Q Fever. Zoonosis. Artisan Minas Cheese. Food security

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mapa das regiões produtoras de queijo artesanal.....	19
Figura 2 – Fluxograma de produção do queijo Minas Artesanal.....	20
Figura 3 – Mapa da Microrregião do Serro produtora de queijo Minas Artesanal.....	22
Figura 4 – História natural da febre Q humana na ausência de tratamento. ....	28
Figura 5 – Esquema ilustrando o ciclo de <i>C. burnetii</i> .....	30
Quadro 1 - Resumo dos casos de febre Q publicados no Brasil .....	34
Quadro 2 – Primers utilizados para detecção de <i>Coxiella burnetii</i> .....	42
Figura 6 – Distribuição espacial dos resultados positivos e negativos para <i>C. burnetii</i> das amostras de queijo Minas Artesanal coletadas na microrregião do Serro. ....	49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características socioeconômicas e demográficas descritivas da população do estudo (variáveis qualitativas) .....	45
Tabela 2 – Características descritivas da produção de queijos da população do estudo (variáveis qualitativas).....	46
Tabela 3 – Características descritivas do rebanho, da produção de leite da ordenha da população do estudo (variáveis qualitativas) .....	47
Tabela 4 – Características descritivas da população do estudo (variáveis quantitativas).....	48
Tabela 5 – Análise univariada para presença de <i>C. burnetii</i> nos queijos Minas Artesanais da microrregião do Serro. ....	50
Tabela 6 – Análise multivariada para presença de <i>C. burnetii</i> nos queijos Minas Artesanais da microrregião do Serro .....	51

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

EMATER	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural
EPAMIG	Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
HIV	Vírus da imunodeficiência Humana
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
IPHAN	Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional
LPS	Lipopolissacarídeo
LQL	Laboratório de Qualidade do Leite
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
QMA	Queijo Minas Artesanal

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	17
	<b>2.1 QUEIJOS ARTESANAIS NO BRASIL</b>	17
	2.1.1 Queijo Minas Artesanal	18
	2.1.2 Queijo Minas Artesanal do Serro	21
	<b>2.2 INOCUIDADE MICROBIOLÓGICA DOS QUEIJOS ARTESANAIS</b>	22
	<b>2.3 FEBRE Q</b>	24
	2.3.1 Etiologia	24
	2.3.1.1 Caracterização do agente etiológico	24
	2.3.1.2 Fases antigênicas	25
	2.3.2 Distribuição geográfica	25
	2.3.3 Histórico	26
	2.3.4 Patogenia	27
	2.3.4.1 Infecção no ser humano	27
	2.3.4.2 Infecção nos animais	29
	2.3.5 Fontes de infecção e vias de transmissão	30
	2.3.6 Situação no Brasil	32
	<b>2.4. FEBRE Q E PRODUTOS LÁCTEOS</b>	35
	<b>2.5 FATORES DE RISCO PARA <i>C. burnetii</i> EM ANIMAIS</b>	38
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b>	41
	3.1 OBJETIVO GERAL	41
	3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	41
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	42
	4.1 DELINEAMENTO E LOCAL DO ESTUDO	42
	4.2 PLANEJAMENTO AMOSTRAL	42
	4.3 COLETA DE DADOS SOBRE AS PROPRIEDADES E PRODUTORES	42
	4.4 COLETA DAS AMOSTRAS DE QUEIJOS	42
	4.5 ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIAS	43
	4.6 ANÁLISES MOLECULARES	43
	4.6.1 Extração de DNA	43
	4.6.2 Amplificação de DNA	43
	4.6.3 Sequenciamento do DNA	44

## SUMÁRIO

	<b>4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E EPIDEMIOLÓGICAS .....</b>	<b>45</b>
	<b>4.9 COMITÊ DE ÉTICA .....</b>	<b>45</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
	<b>5.1 DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO .....</b>	<b>46</b>
	<b>5.2 PESQUISA DE <i>C. burnetii</i> E DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIAS.....</b>	<b>50</b>
	<b>5.3 ANÁLISE FATORES DE RISCO .....</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>57</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O queijo Minas Artesanal é um dos mais antigos e tradicionais queijos produzidos no Brasil, sendo a principal atividade geradora de renda para a agricultura familiar, agregando valor ao leite produzido. Além disso, caracteriza a identidade sociocultural do estado, sendo considerado patrimônio histórico imaterial da humanidade pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN, 2008). Atualmente, Minas Gerais possui sete tradicionais microrregiões produtoras de queijo Minas Artesanal reconhecidas pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER) e cadastradas no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA).

A produção de queijo Minas Artesanal é caracterizada pela utilização de leite cru, o que pode representar um grande risco à saúde dos consumidores, por ser uma matéria prima potencialmente veiculadora de microrganismos zoonóticos.

*Coxiella burnetii* é uma bactéria zoonótica que pode infectar uma grande variedade de animais, entre eles, os bovinos. Esse microrganismo geralmente não causa manifestações clínicas nestes animais, mas pode ser transmitido ao ser humano por meio da inalação de aerossóis contaminados originários da urina, fezes, leite, líquido amniótico ou pela ingestão de leite cru proveniente de animais infectados (CDC, 2016).

No ser humano, a infecção por *C. burnetii* causa uma doença denominada febre Q. Essa doença possui um amplo espectro de manifestações clínicas, podendo ir desde uma doença febril limitada até a pneumonia, hepatite, endocardite e meningoencefalite. Em mulheres infectadas durante a gravidez pode causar aborto espontâneo, parto prematuro ou recém nascido com baixo peso (CDC, 2016).

A via de entrada do agente no ser humano pode determinar, em parte, a manifestação clínica predominante. Quando a contaminação ocorre por meio de aerossóis contaminados, a manifestação clínica mais frequente é a pneumonia; quando ocorre por meio da ingestão de leite cru ou seus derivados, é mais frequente a hepatite (ANGELAKIS; RAOULT, 2010).

Uma das características mais importantes de *C. burnetii* é a sua elevada resistência ao calor, à dissecação e a muitos desinfetantes, permitindo a este microrganismo sobreviver por um longo período no ambiente e se manter infeccioso. Essa alta resistência associada à alta virulência, fizeram com que esta bactéria seja considerada uma possível arma de bioterrorismo classificada como agente de categoria B. Estudos mostram que apenas uma única célula de *C. burnetii* inalada pode produzir doença clínica (RAOULT; MARRIE, 1995; RAOULT et al., 1993).

Por outro lado, o fato dessa bactéria apresentar alta resistência térmica fez com que os parâmetros de tempo e temperatura da pasteurização “alta temperatura por tempo curto” (HTST) empregados no mundo fossem definidos após estudos sobre o tempo e temperatura necessários para eliminação de *C. burnetii* e *Mycobacterium tuberculosis* (LENNETTE et al., 1952).

Com a legalização da produção e comercialização do queijo Minas Artesanal, estudos sobre a presença de *C. burnetii* nesse produto tornam-se altamente relevantes, já que este tipo de queijo por ser produzido com leite cru pode ser uma das fontes de contaminação do ser humano. A febre Q é considerada um importante problema de saúde pública em diversos países, no Brasil é uma doença negligenciada com poucos estudos disponíveis, principalmente aqueles envolvendo alimentos.

Lamas et al. (2013) analisaram a presença de *C. burnetii* em pacientes operados para endocardite no período entre 1998-2009, em um hospital referência em cirurgia cardíaca no Rio de Janeiro, e demonstraram que das 51 válvulas testadas, uma foi positiva para *C. burnetii*. Em outro estudo semelhante Siciliano et al. (2006) analisaram um total de 61 pacientes com diagnóstico de endocardite e encontraram um positivo para *C. burnetii*. Siciliano et al. (2008) relataram um caso grave de endocardite por *C. burnetii* em um homem de 41 anos, natural do estado da Bahia, associado ao trabalho com gado bovino e consumo habitual de leite cru, que apresentou desfecho fatal.

Mares-Guia et al. (2016) verificaram por PCR a presença de *C. burnetii* em amostras de sangue de pacientes clinicamente suspeitos de dengue. Dos 272 pacientes analisados, 166 (61,3%) tiveram confirmação para dengue e nove (3,3%) foram diagnosticados com febre Q.

De janeiro de 2001 a junho de 2004, 726 pacientes febris foram examinados para infecções rickettsiais, foram encontrados 16 casos (2,2%) de infecção por *C. burnetii*. A manifestação clínica mais frequente (8 casos - 50%) foi síndrome gripal, seguida pela pneumonia, febre de origem indeterminada e síndrome mononucleose símile (dois casos - 12,5%) e por fim linfadenite (um caso - 6,3%) e espondilodiscite associada à osteomielite (um caso - 6,3%) (COSTA, 2006).

Portanto, o objetivo principal deste trabalho foi estimar a prevalência de *C. burnetii* em queijo Minas Artesanal de uma importante região produtora do Brasil. Além disso, identificar os fatores de risco para a presença desse microrganismo nas propriedades estudadas.



## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. QUEIJOS ARTESANAIS NO BRASIL**

A origem do queijo artesanal no Brasil data do período colonial, quando os portugueses tentaram reproduzir, no estado de Minas Gerais, o famoso queijo português Serra da Estrela. No entanto diferenças ambientais como clima, relevo e pastagens, além de ingredientes adaptados da própria região, como o tipo de coalho e fermentos utilizados, diferiram o queijo fabricado no Brasil do queijo português (DORES, 2013; PIRES, 2013).

A produção de queijos artesanais é uma atividade tradicional em muitas regiões do Brasil e é a principal geradora de renda para a agricultura familiar, agregando valor ao leite produzido. Além disso, caracteriza a identidade sociocultural de diversos estados e regiões brasileiras.

Existe, no Brasil, uma produção expressiva de queijos artesanais, porém, por ter sido considerada uma atividade informal por muito tempo, constitui uma atividade pouco documentada e as estatísticas sobre sua produção são escassas. Estima-se que o segmento de queijos artesanais no país represente 40% do total de queijos produzidos (DORES, 2013).

A principal característica da produção dos queijos artesanais brasileiros é a utilização de leite cru o que, por um lado, desenvolve sabor e aroma diferenciados dos fabricados a partir de leite pasteurizado, mas, também, pode representar o risco de ser potencial veiculador de microrganismos zoonóticos.

Devido à importância econômica e social do queijo artesanal no Brasil, em 2011, foi legalizada sua produção e comercialização por meio da Instrução Normativa nº 57 (BRASIL, 2011) substituída pela Instrução Normativa nº 30 (BRASIL, 2013). Desde então diversos estudos têm sido realizados para diagnosticar o quadro atual desses queijos para que não representem risco à saúde do consumidor. Esses estudos também visam à melhoria da qualidade do produto para que a tradição da produção de queijos artesanais seja mantida, assim como a garantia da sustentabilidade deste seguimento da agroindústria familiar.

Dentre os vários queijos produzidos artesanalmente, destacam-se aqueles que já se tornaram conhecidos como típicos de determinadas regiões ou estados. Assim, a denominação dos queijos, muitas vezes, está ligada ao seu local de origem ou de maior produção. As principais regiões produtoras e os respectivos queijos artesanais são: i) o queijo Minas Artesanal, produzido no estado de Minas Gerais; ii) o queijo coalho, produzido na região

Nordeste do Brasil; iii) o queijo Serrano, produzido na região Sul do Brasil e iv) o queijo Marajó, produzido na região Norte do Brasil.

### **2.1.1. Queijo Minas Artesanal**

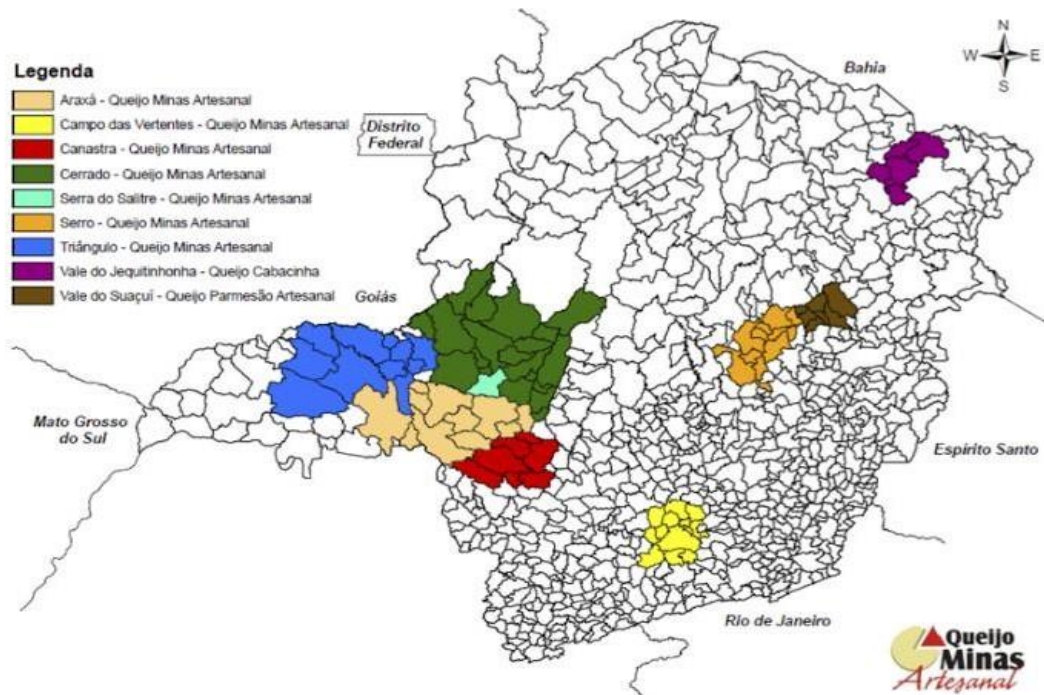
O queijo Minas Artesanal provavelmente é o queijo mais tradicional e antigo do Brasil, com sua origem na colonização portuguesa (IPHAN, 2006; DIAS, 2010). A produção de queijo Minas Artesanal é uma atividade tradicional em vários municípios de Minas Gerais. Essa produção, além de ser a principal atividade geradora de renda de vários produtores agricultores familiares, caracteriza a identidade sociocultural do estado. O processo de fabricação do queijo Minas Artesanal foi considerado pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) como patrimônio histórico imaterial da humanidade em 2008 (IPHAN, 2008).

De acordo com a Lei estadual nº 19.492, de 13 de janeiro de 2011 (MINAS GERAIS, 2011), que dispõe sobre o processo de produção do queijo artesanal em Minas Gerais, é considerado "Queijo Minas Artesanal o queijo elaborado na propriedade de origem do leite, a partir do leite cru, hígido, integral e recém-ordenhado, utilizando-se na sua coagulação somente a quimosina de bezerro pura e no ato da prensagem somente o processo manual, e que o produto final apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas, conforme a tradição histórica e cultural da região do Estado onde for produzido."

Além do coalho e do sal, os produtores de queijo Minas Artesanal utilizam um fermento endógeno, comumente conhecido como pingo, como coadjuvante na produção. Diariamente, após enformagem e salga do queijo, parte do soro eliminado é coletado e adicionado à produção subsequente. O pingo é composto por um grupo de bactérias lacto-fermentativas típicas de cada região que confere ao queijo características sensoriais diferenciadas.

À partir de estudos sobre o processo tradicional de fazer o queijo e de sua importância histórica e cultural, a Empresa de Assistência Técnica de Minas Gerais (EMATER-MG) e o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) determinaram as principais regiões produtoras de queijo Minas Artesanal. As regiões oficialmente reconhecidas pela produção são: Serra da Canastra, Serro, Cerrado, Araxá, e, mais recentemente, Campo das Vertentes (MINAS GERAIS, 2009), Triângulo Mineiro (MINAS GERAIS, 2014a) e Serra do Salitre (MINAS GERAIS, 2014b). O mapa com as regiões produtoras está representado na Figura 1.

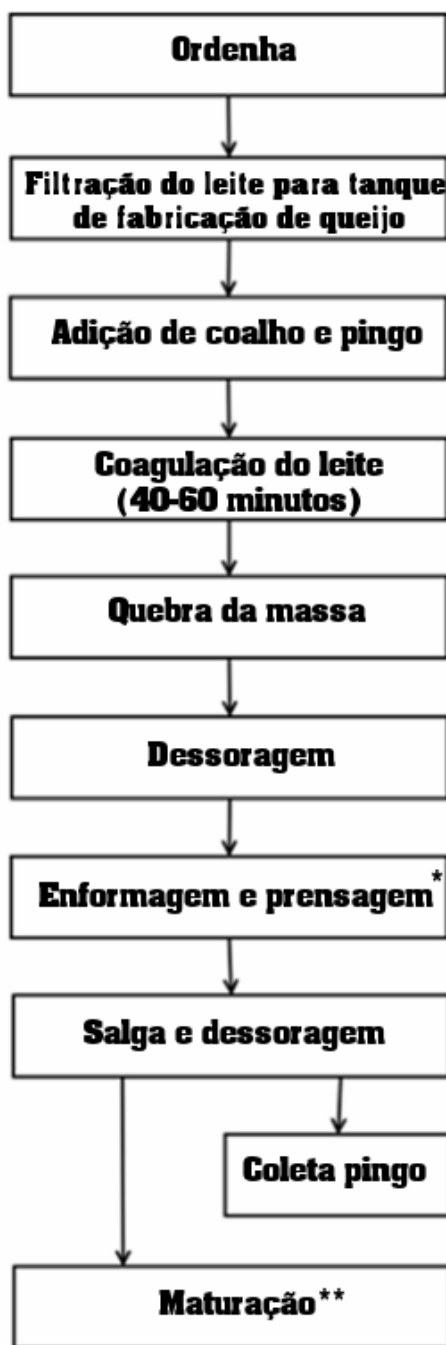
Figura 1 – Mapa das microrregiões produtoras de Queijo Minas Artesanal



Fonte: EMATER, 2014

Poucos são os estudos sobre as tecnologias de produção das regiões do Campo das Vertentes, Triângulo Mineiro e Serra do Salitre. Para as demais regiões, sabe-se que os queijos são fabricados basicamente com a mesma tecnologia. Estudos demonstram que a principal diferença entre os queijos fabricados nas regiões de Araxá, da Canastra, do Cerrado e do Serro está no fato de, na região do Serro, a prensagem manual ser realizada sem o auxílio de tecido, ao contrário das outras três regiões (PINTO, 2004; MARTINS, 2006; DORES, 2013). Porém as características finais do queijo variam conforme a região do estado onde é produzido. Na figura 2 está representado o fluxograma de produção e apontada a principal diferença de fabricação de acordo com a região em que é produzido o queijo.

Figura 2 – Fluxograma de produção do Queijo Minas Artesanal



\*Realizada com auxílio de tecido nas regiões de Araxá, Cerrado e Serra da Canastra e sem na região do Serro.

\*\* 14 dias de maturação para a região de Araxá, 17 dias de maturação para a região do Serro e 22 dias de maturação para as demais regiões.

Fonte: Adaptado de Araújo (2004), Martins (2006) e Dores (2013)

### **2.1.2. Queijo Minas Artesanal do Serro**

Na segunda metade do século XVIII, com a decadência do ciclo do ouro, o município do Serro intensificou sua atividade agropecuária e, nesse momento, a produção de queijos aumentou significativamente representando uma das principais fontes de renda do município pela qualidade e pelo volume produzido. A cidade do Serro disseminou a produção de queijo para as cidades vizinhas.

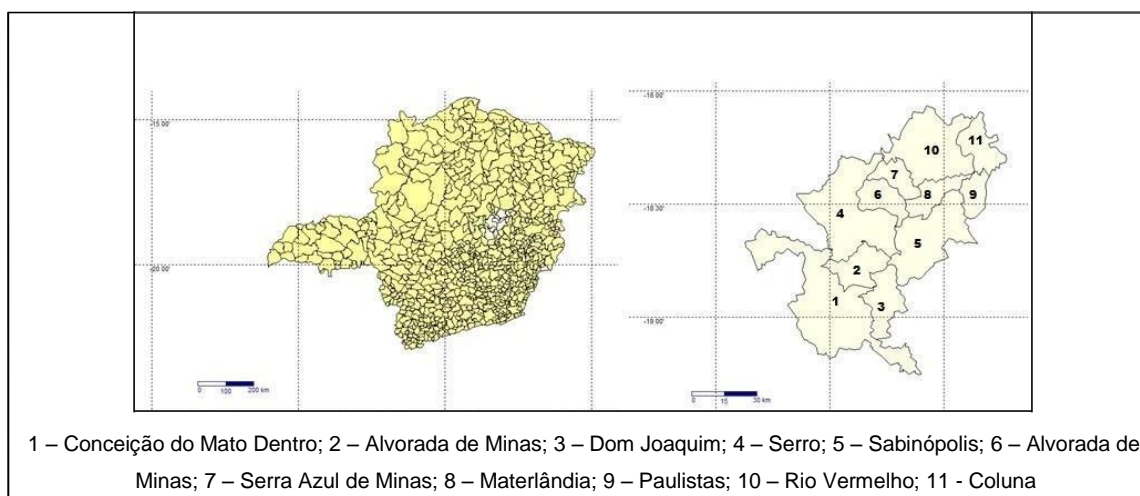
A microrregião do Serro fica localizada em uma área montanhosa, na região do Alto do Jequitinhonha, no estado de Minas Gerais. A região possui clima Tropical de Altitude, com temperatura média em torno de 20°C, com chuvas bem distribuídas entre os meses de setembro a março, altitude variando de 600 a 1200 metros e um relevo com aproximadamente 11% de área plana, 22% de área ondulada e 67% de área montanhosa (MINAS GERAIS, 2002a).

Entre os fatores que historicamente induziram os produtores de leite da região a converterem sua produção em queijo, está o isolamento da área e o reduzido número de estradas de rodagem, que ainda hoje representa um sério problema ao desenvolvimento dos municípios da região (MINAS GERAIS 2002a).

As características peculiares do queijo do Serro se dão por um conjunto de fatores como: altitude, clima, umidade do ar, alimentação das vacas, que contribuem diretamente no grupo de bactérias que proporcionam sabor ao queijo. Sabe-se que os capins nativos, principalmente o meloso, interferem na consistência do queijo e que as pastagens formadas artificialmente devem ser conjugadas com o capim nativo para a preservação das características do leite (PIRES, 2003).

Motivado por toda a história e tradição da região do Serro, em 2002, por meio da Portaria 546 do IMA (MINAS GERAIS, 2002b) foi delimitada a microrregião do Serro como produtora de queijo Minas Artesanal. De acordo com esta Portaria, a microrregião é composta pelos municípios de Alvorada de Minas, Conceição do Mato Dentro, Dom Joaquim, Materlândia, Rio Vermelho, Sabinópolis, Santo Antônio do Itambé, Serra Azul de Minas e Serro. Em 2003, a Portaria 591 (MINAS GERAIS, 2003) incluiu o município de Paulistas à microrregião e, em 2011, a Portaria 1.152 (MINAS GERAIS, 2011) incluiu o município de Coluna à mesma (Figura 3).

Figura 3 – Mapa da Microrregião do Serro produtora de queijo Minas Artesanal



Fonte: Duch (2015)

## 2.2. INOCUIDADE MICROBIOLÓGICA DOS QUEIJOS ARTESANAIS

Os queijos artesanais são produzidos a partir de leite cru e, dessa forma, apresentam uma microbiota bastante diversificada, podendo ser constituída de microrganismos desejáveis e indesejáveis. As bactérias ácido-lácticas (BAL) constituem importante exemplo de microrganismos desejáveis presentes nos diferentes tipos de queijo. No entanto microrganismos indesejáveis deteriorantes e/ou patogênicos também podem estar presentes nos queijos, em função de problemas sanitários do rebanho e de contaminações resultantes de higiene deficitária relacionada a todo o processo de produção, desde a obtenção do leite, passando pela fabricação do queijo até o consumo do produto final.

Os principais entraves para a comercialização dos queijos artesanais são relacionados à segurança do alimento, pois, por estes não passarem por nenhum tratamento térmico, o risco de serem veiculadores de microrganismos patogênicos resulta em importante questão de saúde pública (LOGUERCIO e ALEIXO, 2001). Esses produtos artesanais podem conter microrganismos de diversas fontes (animal, ambiente, ser humano) (ZAFFARI et al., 2007).

Vários estudos (LOGUERCIO e ALEIXO, 2001; ARAÚJO, 2004; PINTO, 2004; MARTINS, 2006; BORGES, 2006; RESENDE, 2010; DORES, 2013) sobre a qualidade microbiológica de queijos artesanais foram realizados para entender a real situação deste alimento e seus riscos para a saúde do consumidor. Dentre os principais microrganismos patogênicos frequentemente pesquisados e detectados estão: *Escherichia coli*, coliformes

fecais, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus*. Esses patógenos são muitas vezes encontrados em números acima dos limites estabelecidos pela legislação.

A legislação brasileira destinada aos queijos artesanais (BRASIL, 2011) estabelece padrão para alguns dos microrganismos patogênicos, porém, para esse produto, são necessárias medidas de segurança ainda mais rigorosas, principalmente no que diz respeito a microrganismos zoonóticos. Os patógenos zoonóticos são muito pouco pesquisados em queijos artesanais e, portanto, muito pouco encontrados, pois a legislação vigente não exige a pesquisa desses patógenos, dando a errônea impressão de que não são um problema.

As zoonoses, doenças típicas dos animais que podem ser transmitidas para o ser humano correspondem aos maiores índices de ocorrência entre as doenças de maior relevância para a saúde pública registradas no Brasil. Atualmente, representam cerca de 75% das doenças emergentes no mundo. Adicionalmente, estudos demonstram que 60% dos patógenos humanos são zoonóticos e que 80% dos patógenos animais têm múltiplos hospedeiros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Algumas zoonoses podem ser transmitidas ao ser humano pela ingestão de produtos de origem animal como, por exemplo, o queijo fabricado a partir de leite cru.

Entre microrganismos zoonóticos que podem ser veiculados pelos queijos artesanais devem ser destacados: *Brucella* spp., *Mycobacterium bovis* e *Coxiella burnetii*. A glândula mamária dos bovinos é um local de multiplicação dessas bactérias. Dessa forma, o leite cru e seus derivados, incluindo diversos queijos artesanais, tornam-se importantes veículos para os que os consomem crus, além de incorrer em risco de contágio para os manipuladores do alimento.

*Mycobacterium bovis* é um agente que causa a tuberculose animal, mas pode afetar também o ser humano, causando a tuberculose zoonótica. Silva et al. (2014) encontraram, em trinta amostras de queijo Coalho Artesanal adquiridas no município de Parnaíba (PI), três amostras (10%) positivas para *M. bovis* utilizando a técnica de PCR em tempo real.

*Brucella* spp. é o agente causador da brucelose, zoonose que pode ser transmitida do animal para o ser humano. Duch (2015), estudando queijo Minas Artesanal da região do Serro, encontrou 30,9% (17/55) de amostras positivas para *Brucella* spp. utilizando análises de Reação de Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento de DNA. Todas as amostras de queijos foram provenientes de rebanhos testados e controlados por meio de exames sorológicos anuais para o monitoramento de *Brucella* spp., segundo determinação da legislação vigente, e apresentaram atestados de controles negativos de veterinários autônomos habilitados.

*Coxiella burnetii* é o agente causador da febre Q, zoonose que pode ser transmitida do animal para o ser humano. Ainda não existem estudos sobre essa bactéria em queijos artesanais no Brasil.

## 2.3. FEBRE Q

### 2.3.1. Etiologia

#### 2.3.1.1. Caracterização do agente etiológico

A febre Q é causada pela bactéria *C. burnetii*. Inicialmente *C. burnetii* foi denominada *Rickettsia burnetii* por apresentar características semelhantes às da família *Rickettsiaceae*, como ser uma bactéria intracelular obrigatória, ter um ectoparasita como reservatório (carrapato) e não poder ser cultivada em meio axênico. No entanto, na década de 1980, o processo taxonômico alterou esta definição porque a análise da sequência 16S rRNA da bactéria revelou que *C. burnetii* pertence à subdivisão gama de Proteobactéria e a família *Coxiellaceae* (RAOULT et al., 2005), enquanto as bactérias do gênero *Rickettsia* pertencem ao grupo alfa-1 de Proteobactéria.

*C. burnetii* é uma pequena bactéria Gram negativa, intracelular obrigatória e pleomórfica (0,2 a 0,4 µm de largura, 0,4 a 1 µm de comprimento). Apresenta uma parede celular típica de bactéria Gram-negativa. No entanto, no que diz respeito à coloração de Gram, nem sempre cora como esperado. Dessa forma, o método de Gimenez (GIMENEZ, 1964) é indicado na coloração de *C. burnetii*. Este microrganismo possui um pequeno cromossomo de formato circular com cerca de 5 Mbp (ANGELAKIS e RAOULT, 2010).

*C. burnetii* apresenta duas variações morfológicas distintas: uma variante de pequenas células (*Small Cell Variant* – SCV) e uma variante de grandes células (*Large Cell Variant* – LCV). Estas formas podem ser diferenciadas pelo tamanho, morfologia e pelos peptidoglicanos constituintes da parede celular (OYSTON e DAVIES, 2011). SCV são consideradas formas vegetativas de resistência (esporos) de *C. burnetii* ao meio extracelular e LCV a forma metabolicamente ativa e sensível ao stress ambiental. SCV podem manter-se viáveis por longos períodos fora do hospedeiro, pois apresentam alta resistência à radiação ultravioleta, dissecação, calor, pressão, estresse osmótico e oxidativo e a muitos desinfetantes (MC CAUL e WILLIAMS, 1981; ARRICAU-BOUVERY e RODOLAKIS, 2005).



A resistência muito elevada, possivelmente relacionada ao seu processo de esporulação, é uma das características mais importantes de *C. burnetii* e permite a este organismo resistir no ambiente por um longo período e permanecer infeccioso. Além da elevada resistência a agentes físico-químicos, *C. burnetii* apresenta ainda um elevado poder infectante. Estudos mostram que apenas uma única célula da bactéria inalada pode produzir doença clínica (RAOULT e MARRIE, 1995; RAOULT et al., 1993). Estas características levaram o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) a classificá-la na categoria B da lista de agentes passíveis de serem usados como arma biológica (CDC, 2016).

### 2.3.1.2. Fases antigênicas

*C. burnetii* apresenta variações antigênicas semelhantes à variação lisa-rugosa da família *Enterobacteriaceae*. Os lipopolissacárideos (LPS) da parede celular são os responsáveis pela variação de fase antigênica (fase I e fase II). Entretanto ao contrário do que acontece com as *Enterobacteriaceae* a variação de fase é irreversível (BOARBI et al., 2015).

A variação de fase ocorre no curso da infecção e é determinante para o diagnóstico sorológico da febre Q, para distinguir infecções agudas e crônicas pela presença do anticorpo anti-*C. burnetii* em fase II ou em fase I, respectivamente.

A fase I é naturalmente encontrada nos animais infectados, artrópodes ou seres humanos, corresponde ao LPS de variação lisa, é altamente contagiosa, uma única célula da bactéria é suficiente para infectar o ser humano (ANGELAKIS e RAOULT, 2010). A fase II corresponde ao LPS de variação rugosa e é menos virulenta que a bactéria na fase I.

### 2.3.2 Distribuição Geográfica

A febre Q é uma zoonose com ampla distribuição mundial. *C. burnetii* está presente em todos os países do mundo, exceto Nova Zelândia (EFSA, 2010).

Na maioria dos países desenvolvidos, esta infecção foi amplamente descrita. Na França e na Alemanha, por exemplo, a doença é considerada um importante problema de saúde pública.

Nos países em desenvolvimento, informações sobre a febre Q são escassas e limitadas a estudos de soroprevalências e relatos de casos. Provavelmente devido a falta de diagnóstico e não a menor incidência.

Epelboin et al. (2016) realizaram uma extensa revisão da literatura disponível sobre a febre Q nos países da América Latina e mostraram que sete países nunca relataram casos de febre Q (Belize, Costa Rica, Guatemala, Guiana, Honduras, Paraguai e Suriname); três não relataram nada desde 1990 (Bolívia, Panamá e Venezuela); sete países relataram uma ou duas publicações desde 1990 (Argentina, Chile, El Salvador, Peru, Trinidad, Uruguai). Colômbia, México e Brasil publicaram mais estudos.

### 2.3.3. Histórico

Em 1935, Edward Derrick foi convidado a investigar um surto de doença não identificada que afetava trabalhadores de abatedouros em Brisbane, Queensland, na Austrália, os principais sintomas relatados eram febre, cefaléia e mal estar. Casos esporádicos da doença continuaram a ocorrer regularmente, Derrick começou a descrever a doença, adotando em 1937 o termo "febre Q" („Q“ para o termo „query“) para descrevê-la. Após tentativas frustradas de isolamento, especulou-se que se tratava de um agente viral. A hipótese da origem rickettsial da doença foi levantada por MacFarlane Burnet e Mavis Freeman, a partir da análise de amostra de material infeccioso enviado por Derrick. Subsequentemente Burnet e Freeman após reproduzirem a infecção em cobaias e outros animais, observaram vacúolos intracelulares preenchidos com material granular em diversas secções de baço coradas pela hematoxilina-eosina. O estudo histopatológico permitiu a visualização de numerosos pequenos bastonetes que pareciam de natureza rickettsial.

Independente do trabalho de Derrick, em 1935, Gordon Davis, do laboratório Rocky Mountain em Hamilton, Estados Unidos, ao investigar a ecologia da febre maculosa observou que carrapatos causavam uma resposta febril nas cobaias nos quais eles se alimentavam. Como o quadro clínico observado nestes animais não sugeria febre maculosa. Em 1938, Cox conseguiu cultivar o agente infeccioso em ovos embrionados. Uma ligação definitiva entre o agente desse estudo e o agente da febre Q australiano se estabeleceu quando no ano de 1938, Rolla Dyer, diretor do *National Institute of Health*, EUA, infectou-se com o organismo com o qual Cox e Davis trabalhavam em Hamilton. A inoculação do agente da febre Q australiano, enviado por Burnet, em cobaias que em seguida foram desafiadas com cepas isoladas do sangue de Dyer possibilitou demonstrar a existência de imunidade cruzada. Essa imunidade foi um indicativo de que os agentes eram, de fato, isolados de um único microrganismo. Em homenagem a Cox e Burnet, que identificaram o agente da febre Q como uma nova espécie de rickettsia essa foi denominada *Coxiella burnetii*.

Desde então a febre Q é mundialmente relatada tanto em casos animais quanto em humanos. A primeira descrição da febre Q no Brasil foi em 1953, em São Paulo (BRANDÃO et al., 1953).

### **2.3.4. Patogenia**

#### **2.3.4.1. Infecção no ser humano**

A apresentação clínica da febre Q no ser humano é extremamente variável, podendo variar de doença assintomática à fatal. A infecção pode se manifestar como doença aguda ou crônica. Aproximadamente 60% dos casos de febre Q são assintomáticos. Entre os pacientes sintomáticos, a maioria (95%) experimentará uma doença leve, sem a necessidade de hospitalização. Pacientes hospitalizados representam apenas 2% dos indivíduos infectados, e apenas 1 em cada 10 deles (0,2% do total) desenvolve a febre Q crônica (MAURIN e RAOULT, 1999).

A febre Q aguda sintomática é inespecífica e possui um amplo espectro de manifestações clínicas, podendo ir desde uma doença febril limitada até pneumonia, hepatite e miocardite (COSTA et al., 2006; CUNHA et al. 2009). A manifestação mais frequente é provavelmente uma doença febril autolimitada associada de intensa cefaleia.

Em um estudo realizado de janeiro de 2001 a junho de 2004, 726 pacientes febris foram examinados para infecções rickettsiais. Foram encontrados 16 evidências sorológicas (2,2%) de infecção por *C. burnetii* e a manifestação clínica mais frequente (8 casos - 50%) foi síndrome gripal, seguida pela pneumonia, febre de origem indeterminada e síndrome mononucleose símile (dois casos - 12,5% cada) e, por fim, linfadenite (um caso - 6,3%) e espondilodiscite associada à osteomielite (um caso - 6,3%) (COSTA et al., 2006).

A síndrome gripal que caracteriza a maioria dos casos de febre Q aguda pode ser facilmente confundível com várias doenças, por exemplo, dengue e outras viroses de grande circulação no Brasil. Por este motivo, muitas vezes a febre Q passa despercebida e o paciente não faz o tratamento correto, não recebe medicação apropriada e pode ter a doença agravada (Figura 4). Além disso, pelos motivos acima citados não se conhece a verdadeira incidência da doença.

Mares-Guia et al. (2016) verificaram por PCR a presença de *C. burnetii* em amostras de sangue de pacientes clinicamente suspeitos de dengue. Dos 272 pacientes analisados, 166 (61,3%) tiveram confirmação para dengue e nove (3,3%) foram diagnosticados com febre Q.

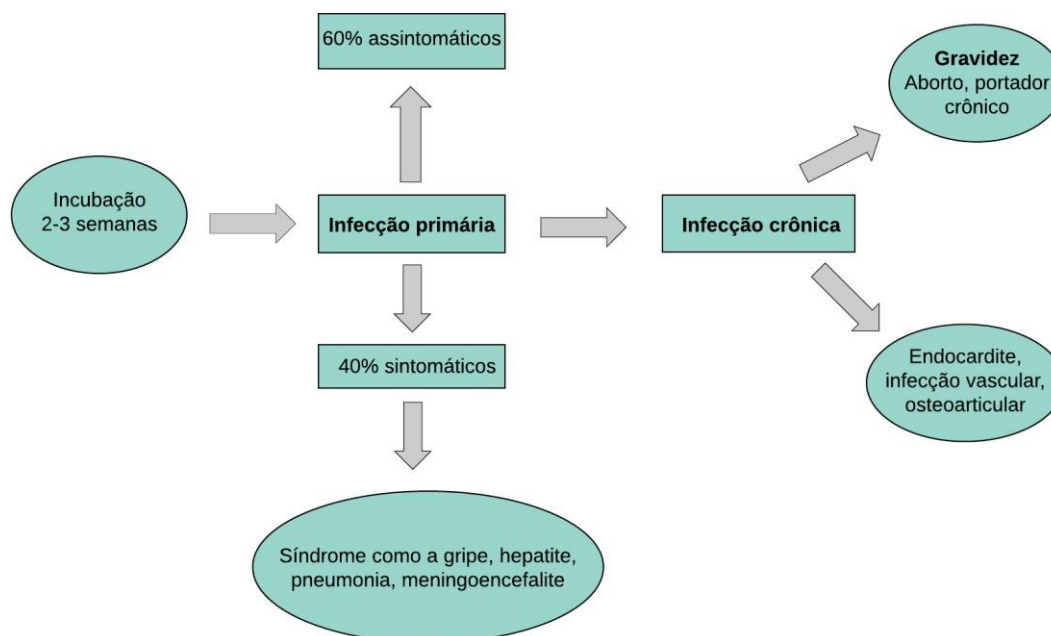
Os fatores que contribuem para essa variação na apresentação clínica da febre Q são:

(i) o local da infecção, via aerossóis ou via digestiva; (ii) a dose de inoculação de *C. burnetii*; (iii) a variante infectante, que pode apresentar diversos potenciais de virulência; e iv) fatores relativos a pessoa infectada, principalmente o estado imunológico do paciente (MAURIN e RAOULT, 1999).

A via de infecção em humanos pode determinar, em parte, a manifestação clínica predominante. Pneumonia é mais frequente quando a infecção ocorre por meio de aerossóis contaminados. A hepatite é a manifestação clínica predominante quando a infecção ocorre por meio da ingestão de leite cru ou seus derivados (ANGELAKIS e RAOULT, 2010). A gravidade da febre Q pode estar associada à dose do inóculo, no geral, doses elevadas podem estar associadas à miocardite (MAURIN e RAOULT, 1999). Finalmente, fatores relacionados à pessoa infectada, em especial o estado imunológico, decorrentes de imunodepressão ou mesmo gravidez, podem influenciar o curso da infecção, incluindo a evolução para a doença crônica (MAURIN e RAOULT, 1999).

A febre Q é considerada crônica a partir da persistência da manifestação clínica por mais de seis meses. Isso ocorre em aproximadamente 5% dos pacientes infectados por *C. burnetii* e pode se desenvolver meses ou anos após a doença aguda. As apresentações clínicas decorrentes da infecção crônica geralmente são: endocardite, infecções valvulares, infecções osteoarticulares, hepatite crônica, infecções pulmonares crônicas, aborto (ANGELAKIS e RAOULT, 2010). Normalmente o coração é o órgão mais envolvido e a endocardite ocorre geralmente em pacientes com lesão valvular prévia ou em paciente imunocomprometidos.

Figura 4- História natural da febre Q humana na ausência de tratamento



Fonte: Angelakis e Raoult (2010)

#### 2.3.4.2. Infecção nos animais

A infecção por *C. burnetii* ocorre em uma grande variedade de animais, incluindo ruminantes, animais domésticos e também animais silvestres (MAURIN e RAOULT, 1999; CDC 2016). Esse microrganismo encontra-se amplamente disseminado na natureza, tendo como principais reservatórios carrapatos, aves e mamíferos. Apesar de qualquer animal destes grupos ser uma potencial fonte de infecção para o ser humano, é o contato com mamíferos domésticos, principalmente bovinos, ovinos, caprinos que constitui a base fundamental da epidemiologia da infecção humana por *C. burnetii* (ANGELAKIS e RAOULT, 2010).

Em contraste com o que acontece no ser humano, nos animais, infecções por *C. burnetii* geralmente são assintomáticas. Como raramente se registra febre nos animais, alguns autores defendem que a designação apropriada para a febre Q nos animais seria de coxielose (LANG, 1988; MAIA, 2016).

Embora seja normalmente assintomática, nos mamíferos pode causar aborto tardio, parto prematuro e natimortalidade. Essas manifestações são mais comuns em caprinos. Na

maioria dos casos, o aborto ocorre no final da gestação, sem sinais clínicos específicos, até que o aborto esteja prestes a acontecer, como observado com brucelose (MAIA, 2016). Os bovinos clinicamente infetados desenvolvem com frequência mastites, retenção placentária e metrite (ANGELAKIS e RAOULT, 2010).

A taxa de aborto pode variar de 3 a 80%, embora altas taxas de aborto sejam raramente observadas, exceto em alguns rebanhos caprinos (MAIA, 2016). Em rebanhos bovinos, muitas vezes, o número de fêmeas que aborta pode não ser suficiente para alertar o produtor de que existe algum problema e os casos clínicos humanos é que revelam muitas vezes a infecção do rebanho (MAURIN e RAOULT, 1999).

### **2.3.5. Fontes de infecção e vias de transmissão**

Na natureza existem dois ciclos epidemiológicos da febre Q: i) nos animais domésticos, principalmente bovinos ovinos e caprinos, mas também pode ocorrer em cães e gatos; ii) em animais silvestres e seus ectoparasitas, principalmente carrapatos (Figura 4). Os animais silvestres são considerados reservatórios naturais do agente, enquanto os animais domésticos constituem a base epidemiológica da doença no ser humano.

A via mais comum de transmissão da doença dos animais silvestres para os animais domésticos é a via aerógena. Os animais silvestres eliminam *C. burnetti* nos produtos de parto, urina e fezes e através da inalação de aerossóis ou poeira contendo o agente ou do contato com o ambiente contaminado os animais domésticos podem se infectar. A grande resistência desse microrganismo aos fatores ambientais assegura sua persistência no ambiente por um longo período de tempo e pode infectar os animais domésticos. Os animais domésticos também podem contrair a infecção por meio de carrapatos infectados procedentes de animais silvestres.

Apesar de qualquer animal infectado ser uma potencial fonte de infecção para o ser humano, é o contato com mamíferos domésticos, principalmente bovinos, ovinos, caprinos que constitui a base fundamental da epidemiologia da infecção humana por *C. burnetii* (ANGELAKIS e RAOULT, 2010).

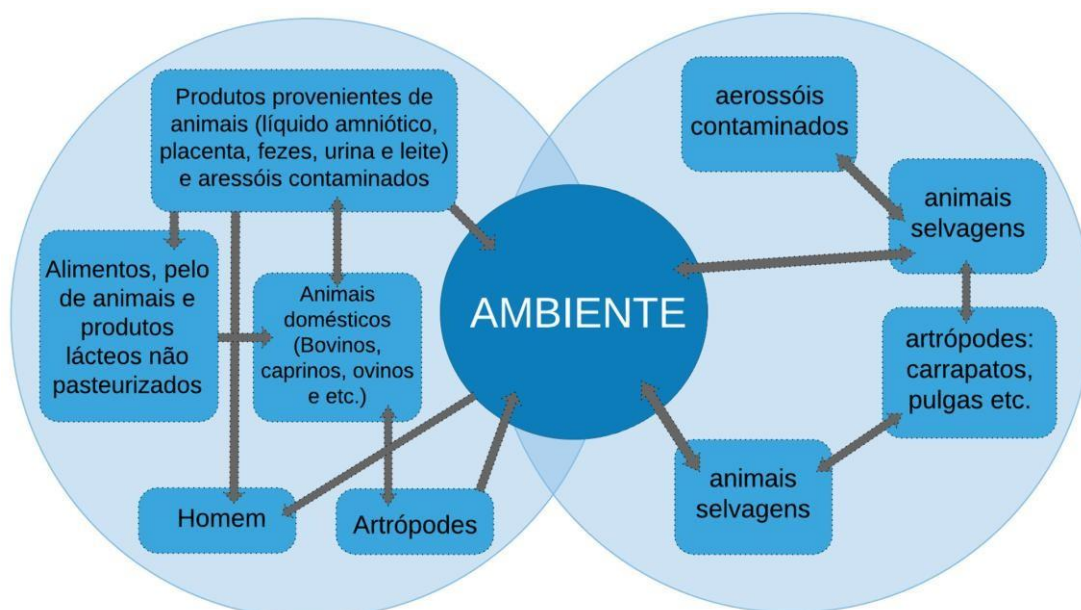
O principal modo de transmissão de *C. burnetii* dos animais para os seres humanos é por meio da inalação de aerossóis ou poeira contendo esporos do agente, do contato direto com os animais infetados e dos seus produtos ou com o ambiente contaminado por esses. Os animais eliminam o microrganismo na urina, fezes, leite, líquido amniótico, placenta e produtos de abortamento.

*C. burnetii*, como já mencionado anteriormente, é um microrganismo muito resistente às condições ambientais e pode mostrar-se viável e infeccioso na natureza por um longo período de tempo além de poder ser dispersado pelo vento. Assim, a febre Q pode ocorrer por meio de infecções indiretas, em pacientes sem qualquer contato evidente com os animais, o que torna difícil o diagnóstico pela ausência de epidemiologia compatível.

Outra possível forma de transmissão de *C. burnetii* dos animais para os seres humanos é através da ingestão de leite cru contaminado ou de seus derivados (FISHBEIN e RAOULT, 1992). O papel dos produtos lácteos não pasteurizados, como os queijos, na transmissão da febre Q para humanos, ainda é controverso (FISHBEIN e RAOULT, 1992; HATCHETTE et al., 2001; MALTEZOU et al., 2004; CAPUANO et al., 2012; HIRAI et al., 2012; ELDIN et al., 2013; GALE et al., 2015; GALIEIRO et al., 2016). Mesmo assim o CDC adverte que uma das medidas preventivas para evitar a febre Q é não consumir leite cru e seus derivados.

Apesar de *C. burnetii* ter sido isolada de carrapatos, é improvável que a transmissão da febre Q por artrópodes em humanos seja significativa, mas estes desempenham um papel significativo na transmissão de *C. burnetii* entre os vertebrados silvestres (ANGELAKIS e RAOULT, 2010). A transmissão sexual de *C. burnetii* foi demonstrada experimentalmente em camundongos infectados. No entanto este modo de transmissão ainda não foi comprovado em seres humanos e animais silvestres (MAURIN e RAOULT, 1999).

Figura 5 – Esquema ilustrando o ciclo de *C. burnetii*



Fonte: Maurin & Raoult, 1999; Fournier et al, 1998; Angelakis & Raoult, 2010; Mares-Guia et al., 2016

O amplo espectro de reservatórios de *C. burnetii* e sua resistência a fatores ambientais, conforme mencionado previamente, torna o rastreamento da fonte de infecção muito difícil.

### 2.3.6. Situação no Brasil

Apesar de ser considerada uma zoonose de distribuição mundial, há poucos relatos de febre Q no Brasil. Acredita-se que essa seja uma doença pouco diagnosticada e possivelmente subnotificada em nosso país (SICILIANO et al., 2008).

As escassas informações sobre a evidência sorológica em humanos e animais se restringem aos estados da Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo. O quadro 1 a apresenta um resumo dos estudos sobre febre Q no Brasil.

A primeira descrição da febre Q no Brasil foi em 1953, em São Paulo. Foram estudadas 643 pessoas, sendo 473 funcionários de frigorífico e 170 funcionários de uma fábrica de vidro. Oito (1,69%) dos funcionários do frigorífico foram positivos para febre Q e dois (1,76%) dos funcionários da fábrica de vidro foram positivos. (BRANDÃO et al., 1953). Ribeiro-Neto et al. (1964) estudaram 200 ordenhadores e tratadores de rebanhos bovinos da região do Vale do Paraíba, São Paulo e 17 foram positivos para febre Q.

Riemann et al. (1974) realizaram uma investigação epidemiológica com pessoas ligadas à Faculdade de Medicina Veterinária de Davies na Califórnia e à Faculdade de Medicina Veterinária de Belo Horizonte, Minas Gerais para comparar a prevalência e fatores associados à febre Q. De 219 pessoas testadas no Brasil 48 (22%) apresentaram anticorpo contra *C. burnetii*. de 138 pessoas testadas na Califórnia 14 (10%) apresentaram anticorpo contra *C. burnetii*. Os fatores associados à disseminação da doença de animais para humanos foram: i) grau de contato com animais; ii) consumo de produtos lácteos não pasteurizados; e iii) duração da residência rural. Em 1975, os mesmos autores, realizaram um estudo em Belo Horizonte e encontraram, entre 144 trabalhadores de abatedouros que participaram do estudo, 42 (29%) de soropositivos para *C. burnetii*. Neste mesmo estudo, foram testados 156 bovinos, sendo que 45 (29%) deles apresentaram anticorpos para *C. burnetii* (RIEMAN et al. 1975).

Mais recentemente foram realizados novos estudos envolvendo a febre Q. Costa et al. (2006) estudaram, de janeiro a junho de 2004, 726 pacientes febris foram selecionados para investigações de infecções rickettsiais como parte de um protocolo específico para investigação etiológica em Juiz de Fora, Minas Gerais. As amostras de soro foram testadas por técnica indireta de microimunofluorescência e foram detectados 16 casos (2,2%) de infecção por *C. burnetii*.



Siciliano et al. (2006) analisaram um total de 61 pacientes com diagnóstico de endocardite e detectaram um positivo para *C. burnetii*. Adicionalmente, Siciliano et al. (2008) relataram um caso grave de endocardite por *C. burnetii* em um homem de 41 anos, natural do Estado da Bahia, que apresentou desfecho fatal. Ele trabalhava com gado bovino e consumia leite cru habitualmente.

Lamas et al. (2009), ao analisarem amostras de soro de pacientes HIV reativos, atendidos em serviço de saúde na região de Jacarepaguá, Município do Rio de Janeiro, identificaram quatro pacientes do sexo feminino com anticorpos anti- *C. burnetii* e uma das pacientes referia contato com material de parto de uma cadela.

Em 2008, foi identificado no município de Itaboraí, Rio de Janeiro, o primeiro caso de febre Q confirmado por análise molecular em um paciente com febre de origem obscura há mais de 40 dias. Com o objetivo de rastrear o foco da infecção, foram realizadas análises em amostras dos familiares e animais do paciente. A esposa do paciente e dois dos 13 cães da propriedade apresentaram sororreatividade (LEMOS, 2011).

Em 2010, um homem de 33 anos do Rio de Janeiro, foi internado em um hospital privado com sintomas de febre, mialgia e tosse seca. O paciente foi tratado com vários tipos de antibióticos, porém não respondeu ao tratamento. As amostras de lavagem de sangue e broncoalveolar foram analisadas utilizando técnicas de cultura e foram negativas para as bactérias e fungos usuais. Amostras de soro foram testadas para por PCR para *C. burnetii* e apresentaram resultado positivo. Foi obtida uma história epidemiológica detalhada e a exposição a cães e gatos, alguns deles parturientes, foi identificada durante os dois anos anteriores à doença. Durante este tempo, após uma doença grave semelhante à gripe, o paciente desenvolveu poliartrite seronegativa (ROZENTAL et al., 2012).

Mares-Guia, et al. (2016) verificaram a presença de *C. burnetii* em amostras de sangue de pacientes clinicamente suspeitos de dengue pela técnica de PCR. No total, 272 pacientes foram analisados, sendo que 166 (61,3%) tiveram a confirmação para dengue, nove (3,3%) foram diagnosticados com febre Q. Um dos pacientes apresentou infecção pelos dois patógenos. Essa taxa de detecção de *C. burnetii* encontrada em pacientes que apresentam febre não é desprezível e deveria ser levada em consideração pelo setor saúde. A febre Q deveria ser incluída no diagnóstico diferencial da dengue. Os resultados de estudos deste tópico mostram a ocorrência de infecção por *C. burnetii* no Brasil, tanto em animais como em seres humanos, e reforçam a necessidade de mais estudos e de vigilância da febre Q no país.

Quadro 1 – Resumo dos casos de febre Q publicados no Brasil

Referência	Estado do Brasil	Positivos	Contexto	Método
Brandão et al., 1953	São Paulo	10	Investigação entre 473 pessoas (473 funcionários de frigorífico e 170 funcionários de fábrica de vidro)	Sorológico
Ribeiro-Neto et al., 1964	São Paulo	17	Investigação com 200 ordenhadores e tratadores de rebanhos bovinos	Sorológico
Riemann et al., 1974	Minas Gerais	48	Investigação epidemiológica com 219 pessoas associadas à Faculdade de medicina veterinária de Belo Horizonte	Sorológico
Riemann et al., 1975	Minas Gerais	42	Investigação com 144 trabalhadores de abatedouros	Sorológico
Costa et al., 2006	Minas Gerais	16	Investigação com 726 pacientes febris entre 2001-2004	Sorológico
Siciliano et al., 2006	São Paulo	1	Investigação entre 61 pacientes com endocardite	Sorológico
Siciliano et al., 2008	São Paulo/ Bahia	1	Relato de caso de endocardite e com desfecho fatal	Sorológico
Lamas et al., 2009	Rio de Janeiro	4	Soroprevalência entre 125 pacientes HIV positivos	Sorológico
Lemos et al., 2011	Rio de Janeiro	1	Caso de febre de mais de 40 dias de duração associada a trombocitose.	PCR
Lamas et al., 2013	Rio de Janeiro	1	Investigação em pacientes operados para endocardite no período entre 1998-2009, em um hospital referência em cirurgia cardíaca. Foram testadas 51 válvulas	PCR
Rozental et al., 2012	Rio de Janeiro	1	Investigação de <i>C. burnetii</i> a partir de amostras de lavagem de sangue e broncoalveolar de um paciente com pneumonia grave após tratamento com metotrexato, resultando no diagnóstico molecular de febre Q em um paciente que teve foi diagnosticado com poliartrite seronegativa activa dois anos antes.	PCR
Mares-Guia et al., 2016	Rio de Janeiro	9	Investigação entre 272 casos suspeitos de dengue	PCR

## 2.4. FEBRE Q E PRODUTOS LÁCTEOS

A forma de liberação de *C. burnetii* difere entre as espécies de animais, o leite é a principal forma de liberação de *C. burnetii* em bovinos e caprinos, entretanto em ovelhas a bactéria é liberada principalmente nas fezes e muco vaginal (RODOLAKIS et al., 2007). As células alvo desse microrganismo são macrófagos e monócitos e quando ocorre mastite nos animais uma grande quantidade de macrófagos é liberada podendo aumentar ainda mais a liberação de *C. burnetii* (BARLOW et al., 2008).

O papel dos produtos lácteos não pasteurizados na transmissão da febre Q para humanos ainda é muito controverso. Cerf e Condron (2006) em sua revisão sistemática sobre a febre Q contestaram a designação de *C. burnetii* como patógeno transmitido por alimentos, bem como, o fato da pasteurização ser baseada neste patógeno. Entretanto, diversos outros autores acreditam na transmissão oral de febre Q (CAPUANO et al., 2012; GALE et al., 2015)

Capuano et al. (2012) afirma que é plausível que a ingestão de produtos lácteos possa constituir também uma causa de infecção humana, principalmente devido à alta resistência de *C. burnetii* que poderia sobreviver por um longo tempo no alimento.

Gale et al. (2015) realizaram simulações de análise de risco e concluíram que os riscos para o ser humano da transmissão de *C. burnetii* pelo consumo de lácteos não pasteurizados não deve ser desprezado apesar dele ser menor em comparação com a inalação de aerossóis contaminados.

A febre Q pode ser causada por múltiplos genótipos e nem todos são infecciosos para o ser humano. Segundo Pearson et al. (2014) o genótipo circulante nos Estados Unidos é o ST20, neste país existe uma alta prevalência de coxielose em bovinos entretanto, poucos casos de febre Q humana. A conclusão dos autores é que esse genótipo é pouco infeccioso para seres humanos, porém os autores alertam que não se sabe se o ST20 é o principal genótipo bovino no mundo.

Por outro lado, o genótipo MST33 já foi detectado em amostras clínicas de seres humanos, cabras e ovelhas. Tilburg et al. (2012) comprovaram que cabras e ovelhas são fontes de um surto de febre Q na Holanda. No mundo existem poucos estudos de genotipagem, portanto, a informação sobre uma possível prevalência global do genótipo MST33 é insuficiente.

Embora exista a controvérsia em relação ao papel dos produtos lácteos não pasteurizados na transmissão da febre Q, alguns estudos vêm sendo realizados com o objetivo

de detectar a presença de *C. burnetii* em produtos lácteos. Capuano et al. (2012) detectaram em um total de 169 amostras de queijos produzidos com o leite de diferentes espécies animais uma prevalência geral de 21,3%, variando entre espécies (39% em queijo de leite de vaca, 26% em queijo de leite de pequenos ruminantes e 6,9% em queijo de leite de búfala). Galieiro et al. (2016) analisaram 84 amostras de queijo produzidos com leite não pasteurizado e detectaram 27 (32,14%) positivos para *C. burnetii*.

Como o método de detecção do patógeno utilizado nos referidos estudos foi a PCR, que não permite a discriminação entre bactérias vivas e mortas, não foi possível confirmar a viabilidade de *C. burnetii*. Esse método é utilizado em muitos estudos porque o isolamento desse microrganismo é difícil, demorado e requerer um laboratório com nível de segurança 3 (NB-3) com pessoal altamente treinado e qualificado. Dessa forma, a detecção de *C. burnetii* geralmente é baseada em métodos moleculares como PCR, nesses casos.

Um estudo realizado na França por Eldin et al. (2013) analisou 70 amostras de queijos produzidos com leite não pasteurizado e encontrou 40 (57,14%) positivos para *C. burnetii* pela técnica de PCR. Posteriormente as amostras positivas por PCR foram inoculadas em fibroblastos de pulmão embrionário humano e não foi encontrada nenhuma célula viável. Como os autores não especificaram o número de dias de maturação dessas amostras e os queijos artesanais franceses, geralmente, passam por longo período de maturação, é possível que o tempo prolongado de maturação tenha inativado a bactéria.

Hirai et al. (2012) analisaram a presença de *C. burnetii* em queijos do mercado de Tóquio e encontraram, em um total de 147 amostras, 28 (19,05%) positivas por PCR. Analisaram a viabilidade inoculando camundongos com as amostras positivas e todas foram consideradas negativas. Porém os autores não relatam se os queijos foram produzidos a partir de leite cru. Capuano et al. (2012) sugeriram que as amostras utilizadas por Hirai et al. (2012) sejam de produtos industriais e que, devido ao processo de pasteurização, as bactérias tenham sido inativadas. Os autores alertam, ainda, que os queijos artesanais produzidos com leite não pasteurizado precisam de maior atenção por serem uma possível causa de transmissão de *C. burnetii* para o ser humano.

Ao contrário de Eldin et al. (2013) e Hirai et al. (2012), que avaliaram que o consumo de queijo não representa um risco para a saúde pública pela transmissão de *C. burnetii* porque não encontraram o patógeno viável nas amostras estudadas, Babudieri e Moscovici (1950) e Spika (1958) avaliaram a sobrevivência de *C. burnetii* em queijos contaminados com o patógeno e relataram que a bactéria permaneceu viável por 17 e 42 dias de maturação, respectivamente. Dessa forma, são necessários mais estudos para saber a viabilidade de *C.*

*burnetii* em queijos, principalmente nos queijos artesanais brasileiros que, apesar da determinação da legislação, praticamente não são maturados, sendo consumidos quase frescos.

Loftis et al. (2010) confirmaram a viabilidade de *C. burnetii* por passagem em camundongos de duas amostras de leite não pasteurizadas e positivas por PCR.

Apesar de a relação de causa-efeito entre o consumo de lácteos não pasteurizados e o desenvolvimento da doença clínica no ser humano ainda não estar totalmente comprovada (EFSA, 2010), há evidências epidemiológicas de casos de febre Q em que o consumo de lácteos não pasteurizados foi a causa mais provável.

Fishbein e Raoult (1992) relataram um surto de febre Q entre pacientes e funcionários de uma instituição psiquiátrica na França. Alguns pacientes e funcionários deixavam a instituição diariamente para trabalhar em uma fazenda em que cabras eram criadas para a produção de queijo feito com leite cru. As taxas da doença foram significativamente maiores entre pessoas que trabalhavam na fazenda e consumiam produtos à base de leite não pasteurizado do que entre as que trabalhavam na fazenda, mas não consumiam produtos não pasteurizados. Os autores concluíram que a associação entre a exposição a aerossóis contaminados e o consumo de lácteos não pasteurizados aumenta o risco de contrair a febre Q.

Outro estudo investigou a incidência da febre Q entre 1.200 crianças hospitalizadas na Grécia. A doença em fase aguda foi diagnosticada em oito (0,67%) dos pacientes. A análise multivariada mostrou que as crianças que relataram consumo de queijo artesanal apresentaram maiores chances para esta doença (MALTEZOU et al., 2004).

Signs et al. (2012) relataram um surto de febre Q em Michigan (EUA) que envolveu um pequeno grupo de indivíduos consumidores regulares de leite não pasteurizado. Shah et al. (2015) descreveram o caso de uma mulher de 52 anos, também em Michigan, com febre Q crônica que se manifestou como endocardite. Histórico subsequente identificou que a paciente consumia leite cru proveniente de uma vaca infectada por *C. burnetii* como a provável fonte do contágio.

Embora a relação entre febre Q e consumo de lácteos não pasteurizados ainda não esteja totalmente provada, existem fortes evidências epidemiológicas de que esta seja uma das rotas de transmissão da doença para o ser humano. Por este motivo, é de suma importância controlar a infecção por *C. burnetii* em rebanhos e, em especial, em rebanhos que tenham sua produção destinada à fabricação de produtos artesanais.

## 2.5 FATORES DE RISCO PARA *C. burnetii* EM ANIMAIS

Os fatores de risco associados à infecção por *C. burnetii* em populações animais podem estar relacionados ao animal, ao rebanho, a fatores ambientais ou à região. Entre os principais fatores associados aos animais, podem ser citados: idade, ordem de parto e raça. Os fatores relacionados ao rebanho são: tamanho, densidade populacional, tipo de exploração, sistema de produção, contato com outros animais, ingresso de novos animais, inseminação artificial, entre outras práticas zootécnicas e sanitárias. Com relação aos fatores ambientais, constata-se uma tendência sazonal da doença. Com relação à região, deve ser observada a proximidade de fazendas com histórico da doença.

Muitos autores relataram a associação entre infecção por *C. burnetii* e medidas de tempo como idade e ordem de parto (MC CAUGHEY et al., 2010; SCHIMMER et al., 2011; BOTTCHEER et al., 2011; GARCIA-ISPIERTO et al., 2011; PAUL et al., 2012). Observa-se associação entre a infecção e o aumento da idade em animais, isso porque a probabilidade de ser infectado pela bactéria, se presente, aumenta com o tempo de exposição (PAUL et al., 2012).

Outro fator de risco para infecção por *C. burnetii* relatado por vários autores foi raça (MC CAUGHEY et al., 2010; RYAN et al., 2011; PAUL et al., 2012). Esses estudos demonstram que o risco de uma vaca ter a doença variou entre as raças, com maior risco em vacas Holandesas do que Jersey (MC CAUGHEY et al., 2010; PAUL et al., 2012). No entanto o motivo dessa variação aparente na susceptibilidade da raça é desconhecido. A variação genotípica entre raças é uma possível explicação que precisa ser investigada (PAUL et al., 2012).

Considerando os fatores relacionados ao rebanho, vários estudos encontraram uma associação entre tamanho do rebanho e infecção por *C. burnetii*, sendo maior o risco de infecção em rebanhos maiores ((MC CAUGHEY et al., 2010; SCHIMMER et al., 2011; RYAN et al., 2011; PAUL et al., 2012; VAN ENGELEN et al., 2014). Essa observação pode ser explicada pelo aumento da probabilidade de transmissão em rebanhos com número elevado de animais (PAUL et al., 2012) bem como com maior circulação de pessoas que trabalham e visitam a fazenda (SCHIMMER et al., 2011). Além disso, como a principal via de transmissão é aerógena e o maior contato entre os animais facilita a transmissão via aerossóis, quanto maior for a densidade populacional, maior será a possibilidade de transmissão da infecção por *C. burnetii*.

Com relação ao tipo de exploração como fator de risco, algumas pesquisas mostram que rebanhos de produção leiteira apresentam prevalências mais elevadas para infecção comparadas aos rebanhos de corte. Mc Caughey et al. (2010) estudaram 723 rebanhos, divididos entre rebanhos leiteiros e de corte, e constataram que ser de rebanho leiteiro foi um fator de risco para infecção por *C. burnetii*. Os animais dos rebanhos leiteiros eram duas vezes mais propensos a serem soropositivos. Provavelmente devido a particularidades de manejo, ao contato mais próximo dos animais e à maior vida útil.

O sistema de criação também pode atuar como fator de risco para a presença de *C. burnetii* no rebanho (CAPUANO et al., 2001; PAUL et al., 2012). Os animais criados em sistema extensivo apresentaram maior probabilidade de serem positivos para *C. burnetii*, porque esse sistema provavelmente promove maior contato aleatório entre os animais. Além disso, os animais criados dessa forma têm mais possibilidade de contato com o ambiente infectado (PAUL et al., 2012).

A inseminação artificial foi um fator de risco relatado por Schimmer et al. (2011), mas, segundo os autores, pode ser um marcador indireto de práticas de manejo adotadas por grandes fazendas.

Alguns estudos indicam que a presença de cães e gatos pode ser um fator de risco associado à infecção por *C. burnetii* no rebanho (CANTAS et al., 2011; SCHIMMER et al., 2011), o que sugere que tais animais facilitem a introdução ou propagação do patógeno no rebanho.

Em geral, a compra de novos animais é um fator de risco bem conhecido para a introdução de doenças infecciosas em rebanhos. Van Engelen et al. (2014) e Paul et al. (2012) observaram que a compra de novos animais com estado de doença desconhecido e a ausência da prática da quarentena representam um fator de risco substancial para a introdução de *C. burnetii* no rebanho.

Diversas práticas relacionadas à higiene foram identificadas em vários estudos como fatores de risco importantes para presença de *C. burnetii* no rebanho. Paul et al. (2012) observaram que boas precauções higiênicas tomadas pelo veterinário antes de entrar no estábulo foram significativamente associadas com chances reduzidas de presença de *C. burnetii* no rebanho. Os veterinários do rebanho podem atuar como transportadores mecânicos e transferir o patógeno dos rebanhos infectados para os não-infectados. Cantas et al. (2011) identificaram que a frequência de limpeza do ambiente em que as vacas ficavam foi considerado um fator de proteção para infecção por *C. burnetii*. Van Engelen et al. (2014) constataram que limpar as camas das vacas pelo menos uma vez ao dia foi associado

negativamente à presença de *C. burnetii* no rebanho. Estas poderiam ser medidas indiretas de práticas de higiene em geral.

As boas práticas de higiene são uma importante forma de reduzir o risco de propagação de doenças infecciosas. Para *C. burnetii*, a prática de remoção do ambiente de resíduos de parto, fezes, urina e excreções do trato genital reduz a transmissão da bactéria para outras vacas do rebanho.

Alguns estudos demonstram uma variação sazonal na ocorrência de infecção por *C. burnetii*, com animais em maior risco no verão (YANASE et al., 1997; CANTAS et al., 2011; PAUL et al., 2012). Nusinovici et al. (2015) relataram a precipitação como fator protetor para a infecção por *C. burnetii* em rebanhos na Suécia. A variação sazonal na ocorrência de febre Q em humanos também foi relatada por vários autores. Na maioria dos estudos, a incidência foi maior na primavera e no início do verão (TISSOT-DUPONT et al., 1999; HELLENBRAND et al., 2001).

Com relação à região em que a fazenda está inserida, Schimmer et al. (2011) encontraram uma relação positiva entre a presença de *C. burnetii* e fazendas localizadas até 8 km de proximidade de fazendas positivas. Os autores afirmam que é muito provável que isso ocorra devido à inalação de aerossóis contaminados. Nusinovici et al. (2015) relataram que para os rebanhos localizados em áreas com alta velocidade do vento e paisagem aberta o risco de infecção aumentou significativamente.



### **3. OBJETIVO**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Estimar a prevalência de *C. burnetii* em queijo Minas Artesanal da Microrregião do Serro e identificar os fatores de risco para a presença desse microrganismo nas propriedades estudadas.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Investigar a presença de DNA de *C. burnetii* em amostras de queijo Minas Artesanal proveniente da microrregião do Serro.
- Realizar análises descritivas da população do estudo.
- Realizar análise de distribuição de frequência.
- Identificar os fatores de risco para a presença de *C. burnetii*.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. DELINEAMENTO E LOCAL DO ESTUDO**

Foi realizado um estudo de corte transversal para estimar a prevalência de *Coxiella burnetii* em propriedades produtoras de queijos Minas Artesanal de uma importante região produtora do Brasil e avaliar fatores associados à presença do patógeno nos rebanhos estudados. O critério utilizado para a inclusão dos produtores na amostra foi de estar cadastrado ou certificado no IMA.

### **4.2. PLANEJAMENTO AMOSTRAL**

A amostra da população-alvo para estimar o percentual de estabelecimentos positivos para *Coxiella burnetii* foi determinada por sorteio aleatório de 55 (44%) queijarias entre as 125 cadastradas que no período das coletas constavam no sistema do IMA. Em cada uma das propriedades sorteadas foi coletado um queijo para representá-la, já que cada partida era feita com o mesmo conjunto de leite oriundo da mesma propriedade. Foram realizadas coletas no período entre Junho e Dezembro de 2014.

### **4.3. COLETA DE DADOS SOBRE AS PROPRIEDADES E PRODUTORES**

Foram aplicados questionários estruturados aos 55 produtores participantes do estudo. O questionário utilizado possui questões organizadas por grupo de conteúdo, enfocando características socioeconômicas das famílias dos produtores, e gerais da propriedade/rebanho, da sanidade do rebanho, da produção, da produtividade, das questões ambientais e das boas práticas de ordenha e produção.

Os dados provenientes da entrevista e resultados de análises laboratoriais, uma vez sistematizados, formam a base de dados do trabalho.

### **4.4. COLETA DAS AMOSTRAS DE QUEIJOS**

As amostras de queijo foram coletadas pela equipe do estudo, que foi capacitada para executar a coleta, armazenamento e transporte de amostras. Os queijos coletados pesavam, em média, 900 g e foram coletados em suas próprias embalagens (embalagem plástica termoencolhível)

Os queijos foram mantidos sob refrigeração (<4°C) até o envio para o Laboratório de Qualidade do Leite (LQL) da Embrapa Gado de Leite, em caixas isotérmicas com gelo reciclável, em quantidade suficiente para garantir a manutenção da temperatura. No LQL, as

amostras foram fracionadas em porções menores de 100 g, acondicionada em bolsas estéreis para amostras sólidas ou líquidas (INLAB), lacradas, identificadas e enviadas ao Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Para este envio as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável em quantidade suficiente para manter a temperatura  $< 4^{\circ}\text{C}$  até ao laboratório de destino, onde foram realizadas as análises laboratoriais: PCR para *C. burnetii* e sequenciamento dos produtos de DNA amplificados.

#### **4.5 ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIAS**

Foram realizadas análises de distribuição de frequências para observar se havia uma diferença na distribuição de frequências das amostras positivas no total de amostras estudadas em duas faixas equidistantes do centro do município do Serro até a amostra mais distante coletada.

#### **4.6. ANÁLISES MOLECULARES**

##### **4.6.1. Extração de DNA**

As amostras de queijo coletadas foram submetidas à análise molecular utilizando o kit comercial para extração de DNA em tecido (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen®) de acordo com as instruções do fabricante.

##### **4.6.2. Amplificação de DNA**

Após a extração do DNA este foi utilizado em ensaios de PCR convencional para detectar *C. burnetii* (Quadro 2). O DNA de *C. burnetii* foi detectado com iniciadores específicos de *C. burnetii* projetados para amplificar o gene IS1111, localizado em uma região conservada do genoma da bactéria.

A amplificação de DNA foi realizada utilizando Platinum Taq DNA polimerase. O tamanho da amostra foi de 4  $\mu\text{L}$  para PCR1 e 2  $\mu\text{L}$  para PCR2. A reação continha 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão PCR 10x, 0,6  $\mu\text{L}$  de primer 10 mM, 0,75-2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM, 0,25 desoxinucleotídeos (20 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato), 0,1  $\mu\text{L}$  de Platinum Taq DNA polimerase (5U/  $\mu\text{L}$  Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e água livre de nucleases (Promega, Madison, WI, EUA). O sucesso da amplificação foi verificado por migração em

gel agarose 1,5% e coloração do gel com solução de GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, EUA).

Quadro 2 – Primers utilizados para detecção de *Coxiella burnetii*

Primers	Sequencias (5' - 3')	Tamanho do fragmento	Temperatura de anelamento
*QBT - 1	TATGTATCCACCGTAGCCAGC	687 pb	60 °C
*QBT - 2	CCCAACAACACCTCCTTATTC		
**QBT N3+ <sup>1</sup>	AAGCGTGTGGAGGAGCGAACC	440 pb	66 °C
**QBT N4- <sup>1</sup>	CTCGTAATCACCAATCGCTTCGTC		

<sup>1</sup> *Nested* PCR/ \*Hoover et al.(1992) / \*\*Sequências de nucleotídeos desenhadas no Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses, ainda em fase de publicação

#### 4.6.3. Sequenciamento do DNA

Os produtos amplificados foram purificados utilizando o kit ilustra GFX RCR DNA and Gel Band Purification® (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante. Para a reação de sequenciamento foi utilizado o Kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction® v.3.1 para purificação o kit BigDye® X-Terminator Purification (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. As análises foram realizadas com um ABI Prism 3730XL, 96 capilares (Applied Biosystems) e as sequências de nucleotídeos foram analisadas utilizando o software MEGA 6. Uma sequência consenso foi estabelecida pelo mesmo software.

#### 4.7. VARIÁVEIS DO ESTUDO

A presença de DNA de *C. burnetii* nos queijos foi a variável dependente e as variáveis explicativas foram agrupadas em três níveis hierárquicos visando análises multivariadas de regressão logística:

- i) distal (características socioeconômicas e demográficas): residência no estabelecimento rural, renda proveniente da venda de queijos, outras rendas, nível de instrução, mão de obra, assistência técnica e tipo de assistência;
- ii) intermediário (produção de queijo): utiliza pingo, utiliza rala, para quem vende o queijo, a pessoa que ordenha é a mesma que fabrica o queijo e quem fabricou o queijo;
- iii) proximal (características do rebanho, produção de leite e ordenha): pré *dipping*, pós *dipping*, linha de ordenha, tipo de ordenha, característica do rebanho (fechado ou compra animais), contato com outros bovinos e número de ordenhas.

#### **4.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS E EPIDEMIOLÓGICAS**

A prevalência de queijos positivos para *C. burnetii* (PCR e sequenciamento do DNA) na amostra analisada foi determinada. No cálculo estatístico, foi utilizado o programa Epiinfo para estimar o intervalo de confiança para uma proporção ( $p$ ) com um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

Foram realizadas análises descritivas das variáveis qualitativas e quantitativas. Análises de regressão logística univariada e multivariada foram realizadas para avaliar os fatores de risco para presença de *C. burnetii* nos queijos.

Nas análises multivariadas, modelos teóricos com três níveis hierárquicos foram construídos de acordo com Victora et al. (1997).

O software SPSS versão 20.0 foi utilizado para as análises de regressão logística. O ajuste do modelo foi avaliado com o teste Hosmer e Lemeshow.

#### **4.9. COMITÊ DE ÉTICA**

Esta pesquisa foi inserida na Plataforma Brasil e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa. Os produtores assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, que lhes assegura sigilo e confidencialidade das informações.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO

A tabela 1 apresenta as características socioeconômicas e demográficas qualitativas descritivas da população estudada. A maioria dos produtores reside no estabelecimento rural (84,1%) e a maior parte da renda familiar é proveniente da venda de queijos (84,1%). A mão de obra é familiar em 68,2% das propriedades e em 27,3% tem empregados fixos contratados. A tabela 2 apresenta as características relativas à produção de queijos (variáveis qualitativas).

Para a produção de queijo 21 produtores (47,7%) utilizam o pingo, sorofermentado. A rala é utilizada por 68,2% dos produtores com diferentes frequências de utilização.

A tabela 3 apresenta as características descritivas relativas a características do rebanho, produção de leite e ordenha. A ordenha é mecânica canalizada em 40,9% das propriedades estudadas. O rebanho é fechado, ou seja, não compra animais em 36,4% das propriedades estudadas. Dos produtores que compram animais 92,85% (26/28) não exigem nenhum documento dos vendedores. Em 70,4% das propriedades estudadas existe contato dos animais da propriedade com os da propriedade vizinha, seja por cerca ou por utilizarem o mesmo touro.

A tabela 4 apresenta as características descritivas das variáveis quantitativas. Os queijos coletados apresentavam entre dois e oito dias de maturação e o tempo de maturação médio que os produtores esperam para vender os queijos para consumo varia entre três e oito dias.

O número de familiares envolvidos com a produção de queijo varia entre zero, nenhum familiar envolvido na produção somente funcionários contratados, e quatro.

Os rebanhos são constituídos por 6 a 91 vacas em lactação, produzindo entre 50 e 1.597 litros de leite, com média de 280,9 litros. Produzindo em média 28 queijos diários de aproximadamente um quilograma.

Tabela 1. Características socioeconômicas e demográficas descritivas da população do estudo (variáveis qualitativas)

<b>Característica</b>	<b>n (%)</b>
<b>O produtor reside no estabelecimento rural</b>	
Não	7 (15,9)
Sim	37 (84,1)
<b>A maior parte da renda familiar é proveniente da venda de queijos</b>	
Não	6 (13,6)
Sim	37 (84,1)
Ignorado	1 (2,3)
<b>Família possui outras rendas</b>	
Não	17 (38,6)
Sim	27 (61,4)
<b>Nível de instrução do produtor</b>	
Analfabeto	1 (2,3)
Fundamental completo	13 (29,5)
Fundamental incompleto	7 (15,9)
Lê e escreve	3 (6,8)
Médio completo	10 (22,7)
Médio incompleto	7 (15,9)
Superior completo	3 (6,8)
<b>Mão de obra</b>	
Familiar	30 (68,2)
Empregados fixos contratados	12 (27,3)
Ignorados	2 (4,5)
<b>Mão de obra recebe treinamento</b>	
Não	1 (2,3)
Sim	43 (97,7)
<b>Assistência técnica</b>	
Não	15 (34,1)
Sim	29 (65,9)
<b>Tipo de assistência técnica</b>	
Privada	16 (36,4)
Pública	11 (25,0)
Pública e privada	2 (4,5)
Não se aplica (não tem assistência técnica)	15 (34,1)

Tabela 2. Características descritivas da produção de queijos da população do estudo (variáveis qualitativas)

<b>Característica</b>	<b>n (%)</b>
<b>Uso do pingo</b>	
Não	23 (52,3)
Sim	21 (47,7)
<b>Utiliza rala</b>	
Não	14 (31,8)
Sim	30 (68,2)
<b>Frequência que utiliza rala</b>	
Diariamente	26 (59,1)
Menos que uma vez por semana	1 (2,3)
Semanalmente	1 (2,3)
Quando está ruim	1 (2,3)
Seis meses por ano	1 (2,3)
Não utiliza	14 (31,8)
<b>Pra quem vende o queijo produzido</b>	
Atravessador	11 (25,0)
Cooperativa	27 (61,4)
Cooperativa e atravessador	2 (4,5)
Cooperativa e consumidor	1 (2,3)
Mercearias, padarias e pequenos mercados	3 (6,8)
<b>Pessoa que ordenha é a mesma que fabrica o queijo</b>	
Não	11 (25,0)
Sim	33 (75,0)
<b>Quem fabricou o queijo</b>	
Homem	34 (77,3)
Homem e mulher	2 (4,5)
Mulher	8 (18,2)



Tabela 3. Características descritiva do rebanho, produção de leite e ordenha da população do estudo (variáveis qualitativas)

Característica	n (%)
<b>Lavagem dos utensílios antes da ordenha</b>	
Não	7 (15,9)
Sim	37 (84,1)
<b>Lavagem úbere</b>	
Teta de todas as vacas sempre	40 (90,9)
Teta e úbere de todas as vacas sempre	2 (4,5)
Teta somente se estiver suja	2 (4,5)
<b>Pré dipping</b>	
Não	13 (29,5)
Sim	31 (70,5)
<b>Pós dipping</b>	
Não	30 (68,2)
Sim	13 (29,5)
Ignorado	1 (2,3)
<b>Lavagem dos utensílios após a ordenha</b>	
Não	1 (2,3)
Sim	43 (97,7)
<b>Linha de ordenha</b>	
Não	35 (79,5)
Sim	9 (20,5)
<b>Tipo de ordenha</b>	
Manual ou mecânica balde ao pé	26 (59,1)
Canalizada	18 (40,9)
<b>Característica rebanho</b>	
Compra animais	28 (63,6)
Completamente fechado	16 (36,4)
<b>O que exigiu dos vendedores na compra</b>	
Guia de trânsito (GTA)	2 (4,5)
Nada	26 (59,1)
Não se aplica (rebanho completamente fechado)	16 (6,4)
<b>Contato com outros bovinos</b>	
Contato por cerca	27 (61,4)
Contato por cerca e utiliza mesmo touro do vizinho	4 (9,0)
Não acontece	5 (11,4)
Ignorados	8 (18,2)
<b>Número de ordenhas</b>	
Uma	16 (36,4)
Duas	27 (61,4)
Ignorados	1 (2,3)

Tabela 4- Características descritivas da população do estudo (variáveis quantitativas)

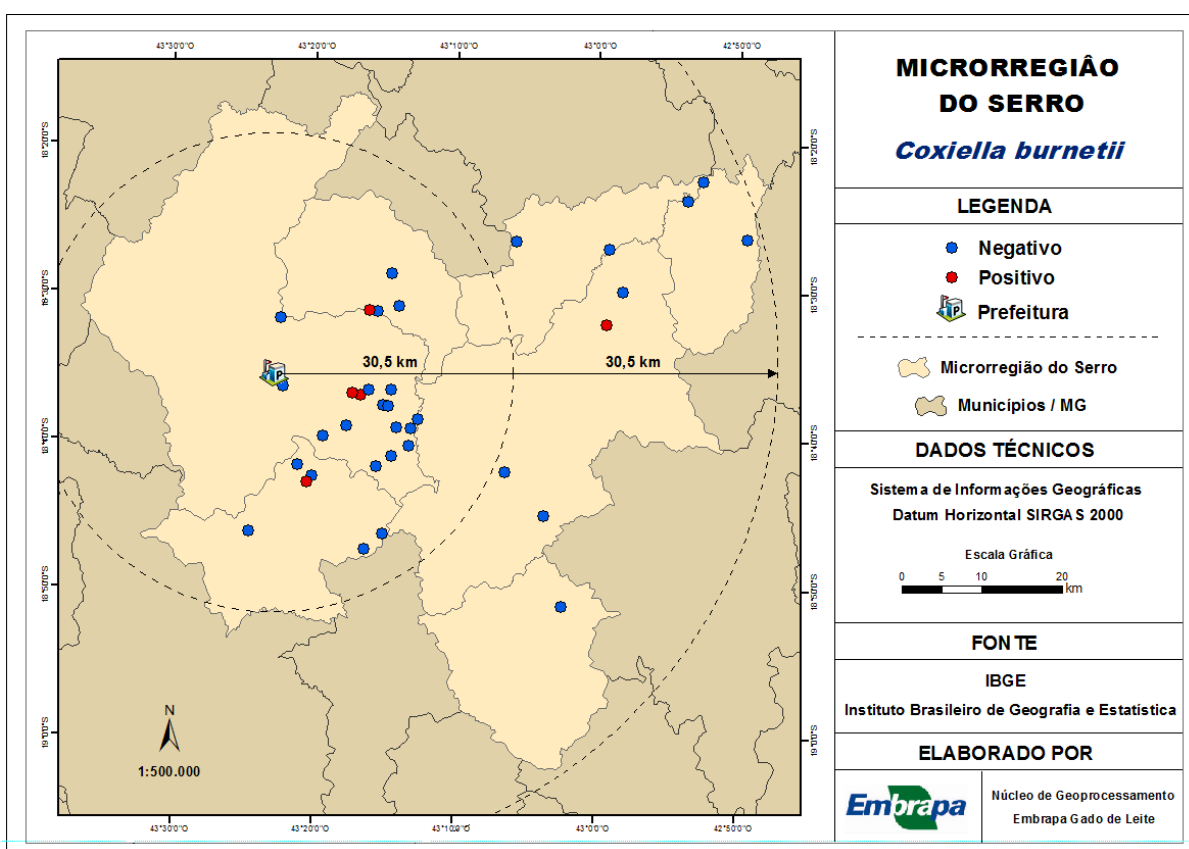
Característica	Valor mínimo	25%	Mediana	75%	Valor Máximo	Moda	Média
<b>Dias de maturação queijo coletado</b>	2	3	4	5	8	4	4,48
<b>Número de pessoas da família</b>	1	2	3	4	6	3	2,95
<b>Número de familiares envolvidos na produção de queijo</b>	0	1	2	2	4	2	1,72
<b>Tempo cadastro no IMA (anos)</b>	1	4	5	6,5	12	6	5,1
<b>Idade produtor</b>	19	43,5	54	68	81	21	54,06
<b>Produção de leite /dia (litros)</b>	50	100	245	350	1597	350	280,95
<b>Vacas em lactação</b>	6	17	28,5	40	91	20	29,80
<b>Vacas secas</b>	0	8	12	20	42	10	14,14
<b>Total de bovinos</b>	24	56	80	100	280	80	90,31
<b>Ultima compra de animais (meses)</b>	0	0	3	10	60	0	8,68
<b>Ultima manutenção das teteiras (meses)</b>	0	1	3	8	33	0	5,43
<b>Média queijos produzidos/dia</b>	7	16	33,5	40	198	35	35,37
<b>Tempo médio de maturação para venda (dias)</b>	3	4	4	8	8	4	5,68

## 5.2 PESQUISA DE *C. burnetii* E DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIAS

Das 55 amostras de queijo coletadas, duas amostras apresentaram quantidade de DNA insuficiente. Do total de amostras analisadas (n = 53), cinco (9,43%) apresentaram DNA de *C. burnetii* confirmado por sequenciamento.

A análise de distribuição de frequências mostrou que não houve uma diferença significativa ( $p=0,9743$ ) na distribuição de frequências das amostras positivas no total de amostras estudadas (Figura 5) em duas faixas equidistantes desde o centro do município do Serro até a amostra mais distante coletada.

Figura 6 – Distribuição espacial dos resultados positivos e negativos para *C. burnetii* das amostras de queijo Minas Artesanal coletadas na microrregião do Serro



Fonte: IBGE

### 5.3 ANÁLISE DE FATORES DE RISCO

A tabela 5 apresenta os resultados da análise de regressão logística univariada. As variáveis uso do pingô, tipo de ordenha, produção de leite e vacas em lactação apresentaram associação ( $p \leq 0,05$ ) com a presença de *C. burnetii* nos queijos Minas Artesanal da Microrregião do Serro.

Tabela 5 – Análise univariada para presença de *C. burnetii* nos queijos Minas Artesanais da microrregião do Serro

Nível	Variável	Total	Positivos	OR	Valor p
NÍVEL DISTAL	<b>Reside no estabelecimento rural</b>				
	Sim	37	0	1,0	0,4865
	Não	7	4	2,02	
	<b>Maior parte da renda venda de queijos</b>				
	Sim	37	3	1,0	0,4648
	Não	6	1	0,4412	
	<b>Nível de instrução</b>				
	Analfabeto a fundamental completo	24	2	1,00	0,6235
	Médio incompleto a superior completo	20	2	1,2222	
	<b>Mão de obra *</b>				
	Familiar	30	1	1,00	0,063
	Empregados fixos contratados	12	3	9,6667	
	<b>Assistência técnica</b>				
	Sim	29	2	1,00	0,4212
	Não	15	2	0,4815	
<b>Tempo cadastro IMA</b>					
1 a 5 anos	21	1	1,00	0,2650	
6 a 12 anos	19	3	3,7500		
<b>Familiars produção</b>					
0 a 2 pessoas	38	4	1,445	0,5437	
3 a 4 pessoas	6	0	1,00		
NÍVEL INTERMÉDIO	<b>Uso do pingo *</b>				
	Sim	21	4	12,09	0,044
	Não	23	0	1,00	
	<b>Utiliza rala</b>				
	Sim	29	1	1,00	0,1072
	Não	15	3	0,1429	
	<b>Pessoa que ordenha mesma que fabrica o queijo</b>				
	Sim	33	2	0,2903	0,2564
	Não	11	2	1,00	
	<b>Produção média de queijos</b>				
7 a 16 queijos	11	0	1,00	0,2142	
17 a 33 queijos	10	1	3,63	-	
34 a 40 queijos	12	0	0,92	0,292	
41 a 198 queijos	10	2	6,77	0,668	
0,264					
NÍVEL PROXIMAL	<b>Característica rebanho</b>				
	Compra animais	28	2	1,00	0,4630
	Fechado	16	2	1,8571	
	<b>Linha de ordenha</b>				
	Não	35	2	1,00	0,1803
	Sim	9	2	4,7143	
	<b>Número de ordenhas</b>				
	Uma	16	0	1,00	0,1422
	Duas	27	4	6,319	
	<b>Tipo de ordenha*</b>				
	Manual e balde ao pé	26	0	1,00	0,0225
	Mecânica canalizada	18	4	16,45	
	<b>Produção de leite*</b>				
	50 a 100 litros	12	0	1,00	0,006
	101 a 245 litros	10	1	3,947	-
	246 a 350 litros	15	0	0,806	0,199
	351 a 1597 litros	7	3	19,444	0,909
	0,131				
<b>Vacas em lactação*</b>					
6 a 17 vacas	12	0	1,00	0,015	
18 a 28 vacas	10	1	3,947	-	
29 a 40 vacas	14	0	0,862	0,199	
41 a 91 vacas	8	3	15,909	0,909	
0,152					
<b>Manutenção teteiras</b>					
Até 6 meses	16	3	1,00	0,5422	
Mais de 6 meses	9	1	0,5417		

\*Variáveis incluídas na análise multivariada / \*\* Das 5 amostras positivas somente 4 produtores responderam o questionário

A tabela 6 apresenta os resultados da análise de regressão logística multivariada. As variáveis que permaneceram no modelo final para um melhor ajuste foram: uso do pingo, tipo de ordenha e vacas em lactação.

Tabela 6 – Análise multivariada para presença de *C. burnetii* nos queijos Minas Artesanais da microrregião do Serro

Variável	Coefficiente	Valor p (modelo)
<b>Uso do pingo</b>	Referência	
Não	18,176	
Sim		
<b>Tipo de ordenha</b>	Referência	
Manual e balde ao pé	19,659	
Mecânica canalizada		0,002
<b>Vacas em lactação</b>	Referência	
6 a 17 vacas	18,170	
18 a 28 vacas	-1,420	
29 a 40 vacas	19,268	
41 a 91 vacas		

Sumário do modelo: Cox & Snell R Square=0,359; Nagelkerke's R Square=0,786; Teste de Hosmer e Lemeshow Qui-quadrado=0,000 (p=1,000); Score teste para significância do modelo= 17,484 (p=0,002)

## 6. DISCUSSÃO

A prevalência de *C. burnetii* em Queijos Minas Artesanais da microrregião do Serro foi estimada em 9,43%. Do conhecimento da equipe do estudo, este é o primeiro trabalho realizado para estimar a prevalência de *C. burnetii* em queijos artesanais no Brasil. No mundo, existem poucos estudos que analisaram a presença dessa bactéria em queijos produzidos com leite cru (HIRAI et al., 2012). Galieiro et al. (2016) analisaram 58 amostras de queijos não pasteurizados produzidos na Itália e encontraram 10 (17,24%) positivos para *C. burnetii*. Outro estudo também realizado na Itália analisou um total de 169 amostras de queijo produzidas com leite de diferentes espécies animais e encontrou uma prevalência geral de 21,3%, variando entre as espécies: 39% em queijo de leite de vaca, 26% em queijo de leite de pequenos ruminantes e 6,9% em queijo de leite de búfala (CAPUANO et al., 2012). Na França, Eldin et al. (2013) analisaram 70 amostras de produtos lácteos produzidos a partir de leite não pasteurizado e encontraram 40 (57,14%) amostras positivas para *C. burnetii*.

Embora a exposição humana a *C. burnetii* por inalação de aerossóis contaminados seja a principal via de transmissão da febre Q, é plausível que a ingestão de queijo feito de leite cru possa constituir uma causa de infecção humana, principalmente devido à alta resistência de *C. burnetii* (CAPUANO et al., 2012). O papel dos produtos lácteos não pasteurizados na transmissão da febre Q para humanos ainda é controverso e poucos dados estão disponíveis para avaliar o risco de infecção ligada ao consumo de queijos artesanais (CAPUANO et al., 2012; HIRAI et al., 2012; ELDIN et al., 2013).

A presença de *C. burnetii* viável em leite cru comercialmente disponível já foi relatada (GALIEIRO et al., 2016) e, apesar de a ligação causa-efeito entre o consumo de lácteos não pasteurizados e o desenvolvimento da doença clínica ainda não estar totalmente comprovada (EFSA, 2010), há evidências epidemiológicas de casos de febre Q em que o consumo de lácteos não pasteurizados foi a causa mais provável (FISHBEIN E RAOULT, 1992; HATCHETTE et al., 2001; MALTEZOU et al., 2004; SIGNS et al., 2012; SHAH et al., 2015; GALE et al., 2015). O caso mais recente ocorreu em Michigan (EUA) em 2011 e envolveu cinco indivíduos consumidores regulares de leite não pasteurizado (SIGNS et al., 2012).

Em um ensaio experimental em que leite bovino e de ovelha foram artificialmente contaminados com *C. burnetii* antes da fabricação do queijo, Babudieri e Moscovici (1950) relataram que a bactéria sobreviveu em queijo produzido a partir de leite bovino contaminado por um período de 17 dias de maturação enquanto no queijo produzido com leite de ovelha, *C.*

*burnetii* não permaneceu viável no mesmo período. Em outro estudo semelhante, Spika (1958) avaliou a viabilidade de *C. burnetii* em queijos naturalmente contaminados e verificou que a bactéria permaneceu viável até 42 dias de maturação, não sendo mais detectável com 49 dias de maturação.

Por outro lado, estudo realizado por Eldin et al. (2013), na França, não encontrou células viáveis de *C. burnetii* em produtos lácteos positivos por PCR. Entretanto a realidade da produção e comercialização dos queijos artesanais franceses não é comparável à brasileira, já que eles passam por período de maturação extenso e a maioria dos queijos brasileiros é consumida com pouca ou nenhuma maturação. Segundo Gale et al. (2015), é possível que a combinação de tempo de maturação e forma de processamento (pH mais baixo e tempos de maturação mais longos) na fabricação de queijos não seja propícia para a sobrevivência de *C. burnetii*.

Para os queijos do presente estudo, apesar da legislação determinar um período de 17 dias de maturação (MINAS GERAIS, 2013), segundo respostas dos próprios produtores, o queijo é comercializado entre três e oito dias de maturação. Dessa forma, os queijos analisados no contexto desse estudo poderiam constituir uma fonte de exposição humana a *C. burnetii* viável.

Como, para a produção de Queijo Minas Artesanal, a legislação determina que o leite utilizado deve ser limitado ao produzido na própria fazenda (MINAS GERAIS, 2011), se a bactéria está presente no queijo, conclui-se que a propriedade é positiva para *C. burnetii*.

Dessa forma, a realização desta pesquisa possibilitou conhecer a prevalência de infecção dos rebanhos que têm o leite destinado à produção de queijos artesanais. Esse conhecimento é importante, pois além do risco de transmissão da febre Q pelo consumo do queijo contaminado, existe a possibilidade de transmissão, via aerossóis contaminados, para ordenadores, tratadores, médico veterinário, manipuladores e, também, outras pessoas que vivam próximas à propriedade (MC QUISTON e CHILDS, 2002).

Para evitar a transmissão da febre Q, tanto via consumo de queijo quanto inalação de aerossóis contaminados, é necessário controlar a infecção por *C. burnetii* nos animais o que demandou estudar os fatores de risco associados à presença da bactéria nos rebanhos do presente estudo.

Os fatores que permaneceram no modelo final como explicativos para presença de *C. burnetii* nos queijos foram: número de vacas em lactação, tipo de ordenha e uso do pingo. Um maior o número de vacas em lactação representou um fator de risco para a presença de *C. burnetii* no queijo. Esse resultado está de acordo com outros estudos ((MC CAUGHEY et al.,

2010; SCHIMMER et al., 2011; RYAN et al., 2011; PAUL et al., 2012; VAN ENGELEN et al., 2014). Esse achado pode ser explicado pelo aumento da probabilidade de transmissão com o aumento do número de animais no rebanho (PAUL et al., 2012) bem como pela maior circulação de pessoas que trabalham e visitam a fazenda (SCHIMMER et al., 2011). Além disso, pode estar relacionado à maior densidade populacional, já que a principal via de transmissão é aerógena e o maior contato entre os animais facilita a transmissão via aerossóis. Adicionalmente, rebanhos maiores podem apresentar diferentes práticas de gestão que sejam favoráveis a uma infecção por *C. burnetii* (VAN ENGELEN et al., 2014).

Outro fator que se mostrou associado à presença de *C. burnetii* nos queijos foi o tipo de ordenha. As propriedades que utilizam ordenha mecânica canalizada apresentaram maior chance de serem positivas para *C. burnetii* em relação àquelas que utilizam ordenha manual ou mecânica balde ao pé. As práticas de gestão, o comportamento das vacas e as estruturas de contato são obviamente diferentes entre rebanhos com ordenha automática e rebanhos com ordenha manual (JACOBS e SIEGFORD, 2012).

O uso do pingço para a produção dos queijos também foi um fator associado à presença de *C. burnetii*. A legislação que regulamenta o processo de produção do Queijo Minas Artesanal (MINAS GERAIS, 2011) determina que, na fabricação do queijo Minas Artesanal, uma das etapas é a adição do pingço. Apesar disso, 52,3% dos produtores não utilizam tal ingrediente para a fabricação do queijo. No entanto o motivo da associação entre o uso do pingço à presença de *C. burnetii* ainda é desconhecido e precisa ser investigado mais profundamente. Uma possível explicação é que o pingço, que, muitas vezes, fica, de um dia para o outro, em recipiente aberto e sem proteção, podendo ser então contaminado.

Na produção de queijos artesanais, é muito comum e permitido pela própria legislação que o local de produção seja anexo ao estábulo e ao local de ordenha. Dessa forma, os animais estariam próximos ao local de produção dos queijos. Como esses eliminam *C. burnetii* na urina, fezes, leite, líquido amniótico, placenta e produtos de abortamento, poeira contendo esporos do agente poderiam contaminar o pingço e posteriormente o queijo.

*C. burnetii* pode sobreviver por muito tempo em solo e poeira e permanecer viável (FRANGOULIDIS, 2010). Vários autores relatam via aerossóis como tendo um papel importante na disseminação de *C. burnetii* (KARAGIANNIS et al., 2009; PORTEN et al., 2006; GILSDORF et al., 2007; TISSOT DUPONT et al., 2004). Em um surto de febre Q na Holanda as pessoas que viviam dentro de 2 km de uma grande fazenda de cabras leiteiras infectadas apresentaram um risco de infecção muito maior que as que vivem a mais de 5 km de distância (SCHIMMER et al., 2010).



Dessa forma, é possível levantar a hipótese de que o vento possa carrear o patógeno ao ambiente de produção dos queijos, contaminando o pingo. Entretanto, como nesse estudo não foram realizadas análises do pingo não pode-se afirmar que o pingo estava contaminado.

No presente estudo os rebanhos em que novos animais eram inseridos não apresentaram diferença significativa em relação aos rebanhos fechados. Na literatura existem estudos que relatam a associação entre introdução de novos animais e a presença de *C. burnetii* no rebanho (PAUL et al., 2012; VAN ELGELEN et al., 2014). Provavelmente, não ter encontrado essa associação se deve ao pequeno tamanho da amostra e também a baixa prevalência.

Os resultados do presente estudo servem de alerta para os setores da agricultura e saúde sobre a necessidade de controle de zoonoses para que os queijos artesanais sejam seguros ao consumidor. Esta integração de setores facilita uma visão mais global da produção e da comercialização de queijos artesanais, nas quais deve haver um equilíbrio dos aspectos socioeconômicos, histórico-culturais, nunca deixando de lado a prevenção e defesa da saúde do consumidor.

## 7. CONCLUSÃO

A prevalência de *C. burnetii* em propriedades produtoras de queijo Minas Artesanal da Microrregião do Serro foi de 9,43% (5/53), o que pode resultar em risco potencial para a saúde pública. Porém ainda são necessários mais estudos para saber o genótipo de *C. burnetii* presente na região e se esse é infeccioso para o ser humano. Além disso, são necessários estudos para saber a viabilidade dessa bactéria nesses queijos e o impacto da mastite por *C. burnetii* em propriedades produtoras artesanais.

Os fatores de risco para a presença de *C. burnetii* nos queijos foram: número de vacas em lactação, tipo de ordenha e uso do pingo.

Os resultados do presente estudo alertam para a necessidade de integração entre os setores da Agricultura e da Saúde, pois a prevenção da febre Q no ser humano depende do controle desta zoonose nos animais.

## REFERÊNCIAS

- ANGELAKIS, E.; RAOULT, D. Q Fever. *Veterinary Microbiology*, v. 140, p. 297-309, 2010.
- ARAÚJO, R. A. B. M. Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas artesanal da região de Araxá. 2004. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.
- ARRICAU-BOUVERY, N.; RODOLAKIS, A. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Veterinary Research*, v. 36, p. 327–349, 2005.
- BABUDIARI, B.; MOSCOVICI, C. Behaviour of *Coxiella burnetii* with physical and chemical treatment. *Rendiconti - Istituto Superiore Di Sanità Journal*, v. 13, p. 739–748, 1950.
- BARLOW, J.; RAUCH, B.; WELCOME, F.; KIM, S. G.; DUBOVI, E.; SCHUKKEN, Y. Association between *Coxiella burnetii* shedding in milk and subclinical mastitis in dairy cattle. *Veterinary Research*, v. 39, n. 23, 2008.
- BORGES, M. F. Diagnóstico da contaminação por bactérias patogênicas em uma indústria processadora de queijo coalho e detecção de genes associados a fatores de virulência. 2006. 199 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- BOTTCHER, J.; VOSSSEN, A.; JANOWETZ, B.; ALEX, M.; GANGL, A.; RANDT, A.; MEIER, N. Insights into the dynamics of endemic *Coxiella burnetii* infection in cattle by application of phase-specific ELISAs in an infected dairy herd. *Veterinary Microbiology*, v. 151, p. 291–300, 2011.
- 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. *Arquivos da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo*, v. 7, p. 127-134, 1953.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 57, de 15 de dezembro de 2011. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, 2011.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 30, de 08 de agosto de 2013. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, 2013.
- BOARBI, S.; FRETIN, D.; MORI, M. *Coxiella burnetii*, agent de la fièvre Q. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 62, p. 102-122, 2015.
- CAPUANO, F.; LANDOLFI, M. C.; MONETTI, D.M. Influence of three types of farm management on the seroprevalence of Q fever as assessed by an indirect immunofluorescence assay. *The Veterinary Record*, v. 149, n. 22, p. 669–671, 2001.

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.

CANTAS, H.; MUWONGE, A.; SAREYYUPOGLU, B.; YARDIMCI, H.; SKJERVE, E. Q fever abortions in ruminants and associated on-farm risk factors in northern Cyprus. *BMC Veterinary Research*, v.17, p. 7-13, 2011.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Q fever. Disponível em: <https://www.cdc.gov/qfever/>. Acesso em: 5 jun. 2017.

CERF, O.; CONDRON, R. *Coxiella burnetii* and milk pasteurisation: an early application of the precautionary principle? *Epidemiology and Infection*, v. 134, p. 946-951, 2006.

COSTA, P. S.; BRIGATTE, M. E.; GRECO, D.B. Questing one Brazilian query: reporting 16 cases of Q fever from Minas Gerais, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 48, n.1, p. 5-9, 2006.

CUNHA, B. A.; NAUSHEEN, S.; BUSCH L. Severe Q fever community-acquired pneumonia (CAP) mimicking Legionnaires' disease: Clinical significance of cold agglutinins, anti-smooth muscle antibodies and thrombocytosis. *Heart & Lung*, v. 38, p.354-362, 2009.

DIAS, J.C. *Uma Longa e Deliciosa Viagem*. 1. ed. Editora Barleus, 2010. 168p.

DORES, M. T. Enterotoxidade de *Staphylococcus aureus* isolados de queijo Minas Artesanal da Canastra. 2013. 66f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

DUCH, A. A. S. Estimativa de prevalência de *Brucella* spp. em propriedades produtoras de queijo Minas artesanal na microrregião do Serro. 2015. 63f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.

ELDIN, C.; ANGELAKIS, E., RENVOISÉ, A., RAOULT, D. *Coxiella burnetii* DNA, but not viable bacteria, in dairy products in France. *The American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, v. 88, n. 4, p. 765–769, 2013.

EFSA. European Food Safety Authority. Scientific opinion on Q fever. *EFSA Journal*, v. 8, n. 5, 2010.

EPELBOIN, L.; NACHER, M.; MAHAMAT, A.; SANTI, V. P.; ARTHAUD, A. B.; ELDIN, C.; ABOUD, P.; BRIOLANT, S.; MOSNIER, E.; GOMES, M. S. M.; VREDEN, S. G.; DEMAR, M. P.; LACERDA, M.; RAOULT, D.; LEMOS, E. R. S.; DISSOU, F. Q fever in French Guiana: Tip of the iceberg or epidemiological exception? *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 5, 2016.

FISHBEIN, D. B.; RAOULT, D. A cluster of *Coxiella burnetii* infections associated with exposure to vaccinated goats and their unpasteurized dairy products. *The American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, v. 47, n. 1, p. 35-40, 1992.

- FRANGOULIDIS D. *Coxiella burnetii*- stability in the environment and molecular typing. In proceedings of: Q-fever conference, Breda, The Netherlands, 2010.
- GALE, P.; KELLY, L.; MEARNS, R.; DUGGAN, J.; SNARY, E.L. 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.
- GALIEIRO, A.; FRANTINI, F.; DOMENICO, M. D.; CURINI, V.; BARONTI, I.; TURCHI, B.; CERRI. Occurrence of *Coxiella burnetii* in goat and ewe unpasteurized cheeses: Screening and genotyping. *International Journal of Food Microbiology*, v. 237, p. 47–54, 2016.
- GARCIA-ISPIERTO, I.; ALMERIA, S.; LOPEZ-GATIUS, F. *Coxiella burnetii* seropositivity is highly stable throughout gestation in lactating high-producing dairy cows. *Reproduction in Domestic Animal*, v. 46, n. 6, p. 1067-1072, 2011.
- GILSDORF, A.; KROH, C.; GRIMM, S.; JENSEN, E.; WAGNER-WIENING, C.; ALPERS, K. Large Q fever outbreak due to sheep farming near residential areas, Germany, 2005. *Epidemiology and Infection*, v. 136, n. 8, p. 1084-1087, 2007.
- GIMENEZ, D. F. Staining rickettsiae in yolk sac cultures. *Stain Technology*, v. 30, p. 135–137, 1964.
- HATCHETTE, T. F.; HUDSON, R. C.; SCHLECH, W. F.; Campbell, N. A.; HATCHETTE, J. E.; RATNAM, S.; RAOULT, D.; DONOVAN, C.; MARRIE, T. J. Goat-associated Q fever: a new disease in Newfoundland. *Emerging Infectious Diseases*, v. 7, n. 3, p. 413–419, 2001.
- HELLENBRAND, W.; BREUER, T.; PETERSEN, L. Changing epidemiology of Q fever in Germany, 1947–1999. *Emerging Infectious Diseases*, v. 7, p. 789–796, 2001.
- HIRAI, A.; NAKAMA, A.; CHIBA, T.; KAI, A. Development of a method for detecting *Coxiella burnetii* in cheese samples. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v. 74, n. 2, p. 175–180, 2012.
- HOOVER, T. A.; VODKIN, M. H.; WILLIAMS, J. C. A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. *Journal of Bacteriology*, v. 174, n.17, p. 5540-5548, 1992.
- IPHAN. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. Queijo artesanal de minas, patrimônio cultural do Brasil, v. 1, p. 156, 2006.
- IPHAN. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. Modo artesanal de fazer queijo de Minas. 2008. Disponível em: <http://portal.iphan.gov.br/pagina/detalhes/65>. Acesso em: 3 jul. 2017.
- JACOBS, J. A.; SIEGFORD, J. M. Invited review: the impact of automatic milking systems on dairy cow management, behavior, health, and welfare. *Journal of Dairy Science*, v. 95, p. 2227–2247, 2012.

KARAGIANNIS, I.; SCHIMMER, B.; VAN LIER, A.; TIMEN, A.; SCHNEEBERGER, P.; VAN ROTTERDAM, B.; DE BRUIN, A.; WIJKMANS, C.; RIETVELD, A.; VAN DUYNHOVEN, Y. Investigation of a Q fever outbreak in a rural area of The Netherlands. *Epidemiology and Infection*, v. 137, n. 9, p. 1283-1294, 2009.

LAMAS, C. C.; ROZENTAL, T.; BOIA, M. N.; FAVACHO, A. R.; KIRSTEN, A. H.; DA SILVA, A. P.; LEMOS, E. R. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in human immunodeficiency virus-positive patients in Jacarepagua, Rio de Janeiro, Brazil. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 15, Suppl 2, p.140–141, 2009.

LAMAS, C. C.; RAMOS, R. G.; LOPES, G. Q.; SANTOS, M. S.; GOLEBIOVSKI, W. F.; WEKSLER, C.; FERRAIUOLI, G. I. D.; FOURNIER, P.; LEPIDI, H.; RAOULT, D. Bartonella and Coxiella infective endocarditis in Brazil: molecular evidence from excised valves from a cardiac surgery referral center in Rio de Janeiro, Brazil, 1998 to 2009. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 7, n. 1, p. e65-e66, 2013.

LEMOS, E. R.; ROZENTAL, T.; MARES-GUIA, M. A.; ALMEIDA, D. N.; MOREIRA, N.; SILVA, R. G.; BARREIRA, J. D.; LAMAS, C. C.; FAVACHO, A. R.; DAMASCO, P. V. Q fever as a cause of fever of unknown origin and thrombocytosis: first molecular evidence of *Coxiella burnetii* in Brazil. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, v. 11, n. 1, p. 85–87, 2011.

LENNETTE, E. H.; CLARK, W. H.; AHINANTI, M. M.; BAUMETTI, O.; COUVERT, J. M. Q fever studies. XIII. The effect of pasteurization on *Coxiella burnetii* in naturally infect milk. *American Journal of Hygiene*, v. 55, n.2, p. 246-253, 1952.

LOFTIS, A. D.; PRIESTLEY, R. A.; MASSUNG, R. F. Detection of *Coxiella burnetii* in commercially available raw milk from the United States. *Foodborne Pathogens Diseases*, v. 7, n. 12, p. 1453–1456, 2010.

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo Minas frescal produzido artesanalmente. *Revista Ciência Rural*, v.31, n. 6, p.1063-1067, 2001.

MAIA, N. E. C. Febre Q em bovinos de leite: Análise da situação de cinco explorações do Concelho de Barcelos. 2016. 68 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2016.

MALTEZOU, H.C.; CONSTANTOPOULOU, I.; KALLERGI, C.; VLAHOU, V.; GEORGAKOPOULOS, D.; KAFETZIS, D. A.; RAOULT, D. Q fever in children in Greece. *The American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, v. 70, n. 5, p. 540–544, 2004.

MARES-GUIA, M. A. M. M.; ROZENTAL, T.; GUTERRES, A.; FERREIRA, M. D. S.; BOTTICINI, R. D. G.; TERRA, A. K. C.; MARRASCHI, S.; BOCHNER, R.; LEMOS, E. R. S. Molecular Identification of Q Fever in Patients with a Suspected Diagnosis of Dengue in Brazil in 2013-2014. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 94, p. 1090-1094, 2016.

MARTINS, J. M. Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas artesanal da Região do Serro. 2006. 158 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

MAURIN, M.; RAOULT, D. Q Fever. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, n. 4, p. 518–553, 1999.

MC CAUGHEY, C.; MURRAY, L. J.; MC KENNA, J. P.; MENZIES, F. D.; MC CULLOUGH, S. J.; O'NEILL, H. J.; WYATT, D. E.; CARDWELL, C. R.; COYLE, P. V. *Coxiella burnetii* (Q fever) seroprevalence in cattle. *Epidemiology and Infection*, v. 138, p. 21–27, 2010.

MC CAUL, T. F.; WILLIAMS, J. C. Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *Journal of Bacteriology*, v. 147, n.3, p. 1063–1076, 1981.

MC QUISTON, J. H.; CHILDS, J. E. Q fever in humans and animals in the United States. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, v. 2, n. 3, p. 179–191, 2002.

MINAS GERAIS. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. Caracterização da Microrregião do Serro como Produtora tradicional de Queijo minas artesanal, 2002a. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br>. Acesso em 3 jul. 2017.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 546, de 29 de outubro de 2002. Identifica a Microrregião do Serro. Belo Horizonte, 2002b.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 591, de 26 de maio de 2003. Inclui município na Microrregião do Serro. Belo Horizonte, 2003.

MINAS GERAIS. Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 1022, de 03 de novembro de 2009. Identifica a Microrregião do Campo das Vertentes. Belo Horizonte, 2009.

MINAS GERAIS. Lei nº 19.492, de 13 de janeiro de 2011. Dispõe sobre o processo de produção do Queijo Minas Artesanal e dá outras providências. Minas Gerais, BR, 2011.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 1.152, de 14 de julho de 2011. Inclui município na Microrregião do Serro. Belo Horizonte, 2011.

MINAS GERAIS. Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 1305, de 30 de abril de 2013. Estabelece diretrizes para a produção do queijo minas artesanal. Belo Horizonte, 2013.

MINAS GERAIS. Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 1397, de 13 de fevereiro de 2014. Identifica a Microrregião do Triângulo Mineiro. Belo Horizonte, 2014a.

MINAS GERAIS. Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 1428, de 29 de agosto de 2014. Identifica a Microrregião da Serra do Salitre como produtora de queijo minas artesanal. Belo Horizonte, 2014b.

MINAS GERAIS. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. Mapa do Queijo Minas Artesanal. 2014. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br>. Acesso em: 13 jun. 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação epidemiológica das zoonoses de interesse para a saúde pública. Boletim eletrônico Epidemiológico, Ano 10, n. 2, 2010. Disponível em: [www.saude.gov.br/svs](http://www.saude.gov.br/svs) Acesso em: 07 jun. 2015.

OYSTON, P. C. F.; DAVIES, C. Q fever: the neglected biothreat agent. *Journal of Medical Microbiology*, v. 60, p. 9-21, 2011.

PAUL, S.; AGGER, J. F.; MARKUSSEN, B.; CHRISTOFFERSEN, A. B.; AGERHOLM, J. S. Factors associated with *Coxiella burnetii* antibody positivity in Danish dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 107, p. 57–64, 2012.

PEARSON, T.; HORNSTRA, H. M.; HILSABECK, R.; GATES, L. T.; OLIVAS, S. M.; BIRDSELL, D. M.; HALL, C. M.; GERMAN, S.; COOK, J. M.; SEYMOUR, M. L.; PRIESTLEY, R. A.; KONDAS, A. V.; CLARK FRIEDMAN, C. L.; PRICE, E. P.; SCHUPP J. M.; LIU, C. M.; PRICE, L. B.; MASSUNG, R. F.; KERSH, G. J.; KEIM, P. High prevalence and two dominant host-specific genotypes of *Coxiella burnetii* in U.S. milk. *BMC Microbiology*, v. 14, n. 41, 2014.

PINTO, M. S. Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas artesanal do Serro. 2004. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

PIRES, M. C. S. Produção artesanal do queijo do Serro. Belo Horizonte 2003. Disponível em: [http://www.mao.org.br/wp-content/uploads/pires\\_01.pdf](http://www.mao.org.br/wp-content/uploads/pires_01.pdf) Acesso em: 8 jun. 2017

PIRES, M. C. S. Memórias e arte do queijo do Serro: o saber sobre a mesa. Belo Horizonte. Ed. UFMG, 2013.

PORTEN, K.; RISSLAND, J.; TIGGES, A.; BROLL, S.; HOPP, W.; LUNEMANN, M.; TREECK, U.; KIMMIG, P.; BROCKMANN, S. O.; WAGNER-WIENING, C.; HELLENBRAND, W.; BUCHHOLZ, U. A super-spreading ewe infects hundreds with Q fever at a farmers' market in Germany. *BMC Infectious Diseases*, v. 6, n.147, 2006.

RAOULT, D.; LEVY, P. I.; DUPONT, H. T.; CHICHEPORTICHE, C.; TAMALET, C.; GASTAUT, J. A.; SALDUCCI, J. Q fever and HIV infection. *AIDS*, v. 7, p. 81-86, 1993.

RAOULT, D.; MARRIE, T. Q Fever. *Clinical Infectious Diseases*, v. 20, n. 3, p. 489-495, 1995.

RAOULT, D.; MARRIE, T; MEGE J. Natural history and pathophysiology of Q fever. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 5, n. 4, p. 219-226, 2005.

RESENDE, M. F. S. Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude e do nível de cadastramento das queijarias nas características físico-químicas e



microbiológicas. 2010. 69f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

RIBEIRO-NETO, A.; NIKITIN, T.; VALENTINI, H.; RIBEIRO, I. F. Estudo sobre Febre Q em São Paulo, ocorrência em rebanhos bovinos do Vale Paraíba. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 6, n.4, p. 137-141,1964.

RIEMANN, H. P.; BRANT, P. C.; FRANTI, C. E.; REIS, R.; BUCHANAN, A. M.; STORMONT, C.; BEHYMER, D. E. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Coxiella burnetii* among students and other personnel in veterinary colleges in California and Brazil. *American Journal of Epidemiology*, v. 100, n. 3, p. 197-208,1974.

RIEMANN, H. P.; BRANT, P. C.; BEHYMER, D. E.; FRANTI, C. E. *Toxoplasma gondii* and *Coxiella burnetii* antibodies among Brazilian slaughterhouse employees. *American Journal of Epidemiology*, v. 102, n. 5, p. 386-393, 1975.

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

ROZENTAL, T; MASCARENHAS, L. F.; ROZENBAUM, R.; GOMES, R; MATTOS G. S.; MAGNO, C. C.; ALMEIDA, D. N.; ROSSI, M. I.; FAVACHO, A. R.; DE LEMOS, E. R. *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. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, n. 5, p. 695-697, 2012.

RYAN, E.D.; KIRBY, M.; COLLINS, D.M.; SAYERS, R.; MEE, J. F.; CLEGG, T. Prevalence of *Coxiella burnetii* (Q fever) antibodies in bovine serum and bulk-milk samples. *Epidemiology and Infection*, v. 139, p. 1413–1417, 2011.

SHAH, S.Y.; KOVACS, C.; TAN, C.D.; PETTERSSON, G.; SHRESTHA, N.K.; LUTWICK, L.; GORDON, S.M. Delayed diagnosis of Q fever endocarditis in a rheumatoid arthritis patient. *IDCases*, v. 2, n. 4, p. 94–96, 2015.

SCHIMMER, B.; TER SCHEGGET, R.; WEGDAM, M.; ZUCHNER, L.; DE BRUIN, A.; SCHNEEBERGER, P. M.; VEENSTRA, T.; VELLEMA, P.; VAN DER HOEK, W. 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 Infectious Diseases*, v. 10, n. 69, 2010.

SCHIMMER, B.; NOTERMANS, D. W.; HARMS, M. G.; REIMERINK, J. H., BAKKER, J.; SCHNEEBERGER, P.; MOLLEMA, L.; TEUNIS, P.; VAN PELT, W.; VAN DUYNHOVEN, Y. Low seroprevalence of Qfever in The Netherlands prior to a series of large outbreaks. *Epidemiology and Infection*, v. 140, p. 27–35, 2012.

SICILIANO, R. F.; STRABELLI, T. M. V.; ZEIGLER, R.; RODRIGUES, C.; CASTELLI, J. B.; GRINBERG, M.; COLOMBO, S.; SILVA, L. J.; NASCIMENTO, E. M. M.; SANTOS, F. C. P.; UIP, D. E. Infective endocarditis due to *Bartonella* spp. and *Coxiella burnetii*: experience at a cardiology hospital in São Paulo, Brazil. *Annals New York Academy of Sciences*, 1078, p. 215-222, 2006.

SICILIANO, R. F.; RIBEIRO, H. B.; FURTADO, R. H. M.; CASTELLI, J. B.; SAMPAIO, R. O.; SANTOS, F. C. P.; COLOMBO, S.; GRINBERG, M.; STRABELLI, T. M. V. Endocarditis due to *Coxiella burnetii* (Q fever): a rare or little diagnosed disease? Case report. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 4, p. 409-412, 2008.

SIGNS, K. A.; STOBIEFSKI, M. G.; GANDHI, T. N. Q fever cluster among raw milk drinkers in Michigan, 2011. *Clinical Infectious Diseases*, v. 55, n. 10, p. 1387–1389, 2012.

ŠIPKA, M. Survival of *Coxiella burnetii* in cheese. *Vet. Glas.*, v. 12, p. 9–12, 1958.

SILVA, M. R.; ROCHA, B. B.; SOUZA, G. N.; FARIA, L. S.; CASTRO, K. N. C.; MOREIRA, M. A. S. Ocorrência de *Mycobacterium bovis* em queijo Coalho na região de Parnaíba, Piauí – Brasil. In: XII Congresso Internacional do Leite, 2014. Porto Velho. Anais...

TILBURG, J. J.; ROEST, H. J.; BUFFET, S.; NABUURS-FRANSSSEN, M. H.; HORREVORTS, A. M.; RAOULT, D.; KLAASSEN, C. H. Epidemic genotype of *Coxiella burnetii* among goats, sheep, and humans in the Netherlands. *Emerging Infectious Disease*, v. 18, p. 887–889, 2012.

TILBURG, J. J. H. C.; ROEST, H. J. I. J.; NABUURS-FRANSSSEN, M. H.; HORREVORTS, A. M.; KLAASSEN, C. H. W. Genotyping reveals the presence of a predominant genotype of *Coxiella burnetii* in consumer milk products. *Journal Clinical Microbiology*, v. 50, p. 2156-2158, 2012.

TISSOT-DUPONT, H.; TORRES, S.; NEZRI, M.; RAOULT, D. Hyperendemic focus of Q fever related to sheep and wind. *American Journal of Epidemiology*, v. 150, n. 1, p. 67–74, 1999.

TISSOT-DUPONT, H.; AMADEI, M. A.; NEZRI, M.; RAOULT, D. Wind in November, Q fever in December. *Emerging Infectious Diseases*, v. 10, n. 7, p. 1264-1269, 2004.

VAN ENGELN, E.; SCHOTTEN, N.; SCHIMMER, B.; HAUTVAST, J. L. A.; VAN SCHAIKA, G.; VAN DUIJNHOFEN, Y. T. H. P. Prevalence and risk factors for *Coxiella burnetii* (Q fever) in Dutch dairy cattle herds based on bulk tank milk testing. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 117, p. 103-109, 2014.

VICTORIA, C. G.; HUTTLY, S. R.; FUCHS, S. C.; OLINTO, M. T. The role of of conceptual frameworks in epidemiological analysis: a hierarchical approach. *International Journal of Epidemiology*, v. 26, p. 224-227, 1997.

YANASE, T.; MURAMATSU, Y.; UENO, H.; MORITA, C. Seasonal variations in the presence of antibodies against *Coxiella burnetii* in dairy cattle in Hokkaido, Japan. *Microbiology and Immunology*, v. 41, p. 73–75, 1997.

ZAFFARI, C. B.; MELLO, J. F.; COSTA, M. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Ciência Rural*, v. 37, n. 3, p. 862-867, 2007.

NUSINOVICI, S.; FRÖSSLING, J.; WIDGREN, S.; BEAUDEAU, F.; LINDBERG, A. Q  
fever infection in dairy cattle herds: increased risk with high wind speed and low  
precipitation. *Epidemiology and Infect.*, v. 143, n. 15, p. 3316-3326, 2015.