



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E  
PARASITÁRIAS**

**MARIANA RAMOS SANTOS**

**PESQUISA DE *COXIELLA BURNETTI* E *RICKETTSIA* SPP. EM  
REBANHOS DE OVINOS PANTANEIROS DOS MUNICÍPIOS DE  
CAMPO GRANDE E TERENOS, MATO GROSSO DO SUL**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Campo Grande - MS**

**2024**

**MARIANA RAMOS SANTOS**

**PESQUISA DE *COXIELLA BURNETTI* E *RICKETTSIA* SPP. EM  
REBANHOS DE OVINOS PANTANEIROS DOS MUNICÍPIOS DE  
CAMPO GRANDE E TERENOS, MATO GROSSO DO SUL**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias pela Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

Orientadora: Dra. Alexandra Rodrigues de Mendonça Favacho.

**Campo Grande - MS**

**2024**

## DEDICATÓRIA

À memória das minhas queridas avós, Dilma e Ramona,

Suas vidas foram os pilares sobre os quais construí não apenas minha educação, mas também meu caráter. Suas histórias, sua sabedoria e seu amor incondicional moldaram cada passo do meu caminho, incluindo esta jornada acadêmica que hoje culmina nesta dissertação.

Dilma, com sua determinação inabalável e sua gentileza compassiva, sempre me ensinou a importância da perseverança e da empatia.

Ramona, com sua sabedoria tranquila e seu amor incondicional, sempre me lembrou a importância de abraçar cada momento com gratidão e humildade.

Ambas, com suas palavras de encorajamento e apoio, me incentivaram sempre a ir em busca dos meus sonhos, mesmo quando o caminho parecia difícil ou incerto.

Embora não estejam mais fisicamente presentes, sinto suas presenças em cada página deste trabalho. Esta dissertação é dedicada a vocês, como uma expressão modesta da minha gratidão eterna por tudo que vocês fizeram por mim e pelo exemplo inspirador que continuam sendo em minha vida.

Que seus espíritos continuem a guiar-me conforme eu avanço neste caminho da aprendizagem e do crescimento.

Com amor e saudade eterna,

Mariana Ramos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por Sua graça e orientação ao longo desta jornada acadêmica. Sua infinita sabedoria iluminou cada passo, e Sua constante presença fortaleceu meu espírito. Que Sua infinita bondade continue a inspirar cada passo do meu caminho, sustentando-me com força e sabedoria para enfrentar os desafios que estão por vir.

À minha família - minha mãe, Patricia Ramos, minha irmã, Izabelly Ramos, e meu noivo, Gabriel Carlos, verdadeiros alicerces que sustentaram cada passo desta jornada, nunca deixando faltar o amor incondicional e o apoio constante que foram essenciais para minha realização.

À minha orientadora, Dra. Alexandra Favacho, foi uma peça fundamental ao longo desses anos de estudo. Agradeço profundamente por compartilhar seus preciosos conhecimentos e por me inspirar a buscar a excelência acadêmica, sempre com dedicação e amor pelo que faz. Dra. Alexandra, sua orientação foi exemplar em cada etapa desta jornada. Seu apoio incansável, paciência e sabedoria foram indispensáveis para o desenvolvimento desta dissertação. Sou profundamente grata por sua dedicação e comprometimento, os quais foram fundamentais para minha realização.

Ao Dr. Marcos Barbosa Ferreira e ao Me. Fernando Alvarenga Reis, pela parceria e ajuda fundamental na coleta de amostras dos ovinos para esta pesquisa. Sua colaboração foi crucial para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Marcelo Bahia Labruna e ao Igor Silva Silito, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, expresse minha sincera gratidão por terem aceitado a parceria para realização da parte sorológica desta pesquisa. Agradeço de coração pela colaboração indispensável para os resultados alcançados

Agradeço às alunas de iniciação científica, Rafaela Lopes Alves, Kelly Melissa Figueiredo e Júlia de Mendonça Favacho, cujo auxílio foi imprescindível durante todo o processo de pesquisa. Suas contribuições foram inestimáveis, e espero sinceramente que esta experiência enriqueça muito suas vidas acadêmicas e profissionais.

Aos mestrandos Alanys Rafaela Bononi da Silva, Guilherme Augusto Henrique da Silva e Judson Matias de Arruda dos Santos, expresso minha profunda gratidão por serem companheiros de jornada que se tornaram verdadeiros parceiros de pesquisa. Suas contribuições superaram todas as expectativas, oferecendo não apenas assistência técnica, mas também uma amizade sincera e palavras de incentivo nos momentos mais desafiadores. É uma honra contar com vocês ao meu lado.

Aos estimados colegas do Laboratório de Parasitologia e Biologia Molecular da Unidep, que se tornaram uma segunda família ao longo desses anos, expresso minha profunda gratidão. O acolhimento caloroso e a troca de conhecimentos que compartilhamos foram cruciais para o meu crescimento acadêmico e profissional. Sinto-me verdadeiramente privilegiada por fazer parte deste grupo excepcional.

Aos coordenadores e professores do programa de pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, pelos ensinamentos enriquecedores e pela oportunidade de aprofundar meu conhecimento na área da saúde única. Cada aula, contribuiu para minha formação e para a construção de um olhar crítico sobre os desafios enfrentados em nossa sociedade.

Agradeço também à parceria entre as instituições Fiocruz Mato Grosso do Sul, Embrapa Gado de Corte do Mato Grosso do Sul e Centro Tecnológico de Ovinocultura (CTO) da Uniderp, por terem aberto suas portas para a realização desta pesquisa. Essa colaboração foi essencial para enriquecer o estudo e ampliar seu impacto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela generosa concessão da bolsa de estudos, que viabilizou minha dedicação integral à pesquisa e à produção deste trabalho.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste projeto, expresso meu mais profundo e sincero agradecimento. Que este trabalho possa representar não apenas o resultado de esforço individual, mas também o fruto de colaboração, aprendizado e dedicação coletiva.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes” (Marthin Luther King).

## RESUMO

Febre Q e febre maculosa brasileira são zoonoses conhecidas mundialmente, causadas por bactérias dos gêneros *Coxiella* e *Rickettsia*, respectivamente, que apresentam ameaça global e têm impactos substanciais na saúde humana e animal, bem como na economia da criação de animais. Com o objetivo de analisar a participação dos ovinos na epidemiologia das doenças causadas por *C. burnetii* e *Rickettsia* spp., um estudo epidemiológico descritivo foi desenvolvido em duas propriedades: Centro Tecnológico de Ovinocultura (CTO) da UNIDERP em Campo Grande e Fazenda Modelo da Embrapa Gado de Corte, em Terenos, ambas no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Amostras de sangue total e sangue-EDTA de 287 ovinos foram coletadas em setembro de 2021, nas duas áreas, seguidas por breve anamnese e coleta de dados dos rebanhos. As amostras de soro foram submetidas à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção de anticorpos IgG *anti-C. burnetii* e *anti-R. rickettsii*. Das 287 amostras testadas, 4 (1,4%) foram reagentes para *C. burnetii*, com títulos iguais a 64. Para *R. rickettsii*, nenhuma amostra foi reagente. Para a investigação de *C. burnetii*, foi realizada PCR nested, utilizando-se oligonucleotídeos *htpAB*, apresentando tamanhos de 687pb e 440pb, na primeira e segunda PCR, respectivamente. Para a detecção de DNA de *Rickettsia* sp., foram utilizados oligonucleotídeos CS-78/CS-323, amplificando um fragmento de 401pb do gene citrato sintase (*glTA*). A presença de inibidores de PCR foi verificada para amplificação do IRBP. Ectoparasitas não foram encontrados no momento da anamnese. Na PCR, os DNAs de *C. burnetii* e de *Rickettsia* sp., não foram amplificados em nenhuma das amostras testadas. O estudo mostrou a presença de anticorpos anti-*C. burnetii* em ovinos pantaneiros nos rebanhos testados, confirmando pela primeira vez que este agente está circulando entre os rebanhos e ausência de *Rickettsia* spp. nas duas áreas estudadas. A compreensão aprofundada da presença desses patógenos em populações animais é crucial para a promoção da saúde pública e da saúde única, integrando aspectos da saúde animal, humana e ambiental.

**Palavras-chave:** Febre Q. Febre Maculosa. Vigilância. Zoonoses. Saúde Única.

## ABSTRACT

*Q fever and Brazilian spotted fever are zoonoses known worldwide, caused by bacteria of the genera Coxiella and Rickettsia, respectively, which present a global threat and have substantial impacts on human and animal health, as well as on the economy of animal breeding. With the objective of analyzing the participation of sheep in the epidemiology of diseases caused by C. burnetii and Rickettsia spp., a descriptive epidemiological study was developed on two properties: Sheep Farming Technological Center (CTO) of UNIDERP in Campo Grande and Fazenda Modelo of Embrapa Beef Cattle, in Terenos, both in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. Whole blood and blood-EDTA samples from 287 sheep were collected in September 2021, in both areas, followed by brief anamnesis and data collection from the herds. The serum samples were subjected to the Indirect Immunofluorescence Reaction (IFAT) to detect anti-C IgG antibodies. burnetii and anti-R. rickettsii. Of the 287 samples tested, 4 (1.4%) were reactive for C. burnetii, with titers equal to 64. For R. rickettsii, no sample was reactive. To investigate C. burnetii, nested PCR was performed using htpAB oligonucleotides, measuring 687bp and 440bp, in the first and second PCR, respectively. For the detection of Rickettsia sp. DNA, CS-78/CS-323 oligonucleotides were used, amplifying a 401bp fragment of the citrate synthase gene (gltA). The presence of PCR inhibitors was checked for IRBP amplification. Ectoparasites were not found at the time of the anamnesis. In PCR, the DNAs of C. burnetii and Rickettsia sp. were not amplified in any of the samples tested. The study showed the presence of anti-C. burnetii in Pantanal sheep in the tested herds, confirming for the first time that this agent is circulating among the herds and the absence of Rickettsia spp. in the two areas studied. An in-depth understanding of the presence of these pathogens in animal populations is crucial for promoting public health and single health, integrating aspects of animal, human and environmental health.*

**Keywords:** Q fever. Spotted fever. Surveillance. Zoonoses. One Health.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Classificação taxonômica do gênero <i>C. burnetti</i> .....	27
<b>Figura 2</b> – Ciclo de transmissão da <i>C. burnetti</i> .....	31
<b>Figura 3</b> – Ordem taxonômica de <i>Rickettsia</i> spp.....	35
<b>Figura 4</b> – Ciclo de transmissão da <i>R. Rickettsii</i> .....	39
<b>Figura 5</b> – Casos confirmados, óbito e letalidade de febre maculosa por ano de início de sintomas, Brasil, 2007 - 2023.....	43
<b>Figura 6</b> – Casos de febre maculosa por região e mês de início de sintomas, Brasil, 2007- 2023.....	44
<b>Figura 7</b> – Casos confirmados febre maculosa por idade e sexo, Brasil, 2007-2023.....	45
<b>Figura 8</b> – Mapa do estado de Mato Grosso do Sul, Cidades Campo Grande e Terenos.....	49
<b>Figura 9</b> – Representação do estado de Mato Grosso do Sul e CTO e EMBRAPA.....	50
<b>Figura 10</b> – Rebanho de ovinos da raça pantaneira.....	52
<b>Figura 11</b> – Identificação de amostras de soro para armazenamento.....	54
<b>Figura 12</b> – Equipe na Embrapa envolvida na coleta, separando amostras para transporte e armazenamento.....	55
<b>Figura 13</b> – Equipe no Centro Tecnológico de Ovinos (CTO) após preenchimento de questionário e coleta de amostras.....	55
<b>Figura 14</b> – Amostras de ovinos, identificadas e separadas.....	56
<b>Figura 15</b> – Coleta de sangue da veia jugular de cordeiro, em centro de manejo, com contenção física na EMBRAPA.....	57
<b>Figura 16</b> – Coleta de sangue da veia jugular de ovino, no brete com auxílio de contenção física no CTO.....	57
<b>Figura 17</b> – Escore de Condição Corporal.....	59
<b>Figura 18</b> – Pesagem de ovino.....	60
<b>Figura 19</b> – Cartão de avaliação do Método Famacha© no controle integrado de verminose .....	61
<b>Figura 20</b> – Preenchimento de questionário.....	62
<b>Figura 21</b> – Verificação dos códigos dos brincos de ovinos para	

preenchimento do questionário.....	63
<b>Figura 22</b> – Ovinos do CTO posicionados no brete avaliação física, preenchimento de questionário e coleta de amostra.....	64
<b>Figura 23</b> – Representação da extração do DNA genômico.....	68
<b>Figura 24</b> – Representação da preparação do Mix para PCR.....	71
<b>Figura 25</b> – Eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe, para protocolo PCR dirigida ao gene IRBP 227 pb. Produto amplificado de PCR a partir de DNA de sangue de ovino.....	87
<b>Figura 26</b> – Eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe, para protocolo PCR dirigida ao gene TRANS 687 pb e QBT 440 pb para <i>C. burnetti</i> . Produto amplificado de PCR a partir de DNA de sangue de ovino.....	88
<b>Figura 27</b> – Eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe, para protocolo PCR dirigida ao gene CS 401 pb para <i>Rickettsia</i> spp. Produto amplificado de PCR a partir de DNA de sangue de ovino.....	89

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> – Protocolos de PCR, oligonucleotídeos “primers” utilizados para detecção de gene IRBP.....	72
<b>Quadro 2</b> – Protocolos de PCR, oligonucleotídeos “primers” utilizados para detecção de <i>C. burnetii</i> na primeira reação de PCR.....	73
<b>Quadro 3</b> – Protocolos de PCR, oligonucleotídeos “primers” utilizados para detecção de <i>C. burnetii</i> na segunda reação de PCR.....	74
<b>Quadro 4</b> – Protocolos de PCR, oligonucleotídeos “primers” utilizados para detecção de <i>Rickettsia</i> spp. na primeira reação de PCR.....	75
<b>Quadro 5</b> – Protocolos de PCR, oligonucleotídeos “primers” utilizados para detecção de <i>Rickettsia</i> spp. na segunda reação de PCR.....	76
<b>Quadro 6</b> – Protocolos de PCR, oligonucleotídeos “primers” utilizados para detecção de <i>Rickettsia</i> spp. na terceira reação de PCR.....	77

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> – Distribuição de sexo nos Ovinos Analisados, Machos: 36 (12,54%) Fêmeas: 251 (87,46%).....	79
<b>Gráfico 2</b> – A representação visual ilustra a distribuição demográfica da nossa população ovina.....	80
<b>Gráfico 3</b> – Representação visual da avaliação do Escore Corporal (ECC) dos ovinos, evidenciando a diversidade nas condições corporais.....	81
<b>Gráfico 4</b> – Representação visual da distribuição das categorias Famacha nos 287 animais analisados.....	83
<b>Gráfico 5</b> – Distribuição de amostras reativas à <i>C. burnetii</i> na diluição 1:64.....	85

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Perfil reatividade na RIFI para <i>C. burnetii</i> (diluição 1:64).....	86
---	----

## LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

%	Percentual
µl	Microlitro
µM	Micromolar
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CTO	Centro Tecnológico de ovinocultura
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
ECC	Escore de Condição Corporal
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<i>et al.</i>	E outros
EUA	Estados Unidos da América
FMB	Febre Maculosa Brasileira
g	Grama
GA	Grupo Ancestral
GT	Grupo Tifo
GTR	Grupo Transicional
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
kg	Quilograma
LPS	Lipopolissacarídeo
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MS	Mato Grosso do Sul
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de base
PBS	Solução tampão fosfato-salina
PCR	Polymerase Chain Reaction/ Reação em cadeia da polimerase
PM	Peso Molecular
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
Spp	Várias espécies
TBE	Tris-borato de EDTA
U	Unidades
°C	Graus Célsius

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>1.1 Considerações Gerais.....</b>	<b>25</b>
<b>2 CONTEXTUALIZAÇÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 <i>Coxiella burnetii</i>.....</b>	<b>27</b>
2.1.1 Agente Etiológico .....	27
2.1.2 Transmissão de <i>C. burnetii</i> .....	28
2.1.3 Reservatórios de <i>C. burnetii</i> .....	30
2.1.4 Situação Epidemiológica da <i>C. burnetii</i> .....	31
2.1.5 Diagnóstico .....	33
<b>2.2 <i>Rickettsia spp.</i> .....</b>	<b>35</b>
2.2.1 Agente Etiológico .....	35
2.2.2 Grupo da Febre Maculosa (GMF) .....	36
2.2.3 Febre Maculosa Brasileira .....	37
2.2.4 Transmissão.....	37
2.2.5 Vetores.....	39
2.1.6 Diagnóstico .....	40
2.2.7 Situação Epidemiológica da Febre Maculosa Brasileira.....	42
<b>2.3 OVINOS PANTANEIROS .....</b>	<b>46</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>47</b>
<b>3.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>47</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>47</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>48</b>
<b>4.1 Desenho do Estudo.....</b>	<b>48</b>
<b>4.2 Considerações Éticas .....</b>	<b>48</b>
4.2.1 Consentimento Informado.....	48
4.2.2 Confidencialidade.....	48
<b>4.3 Manipulação de Amostras.....</b>	<b>49</b>
<b>4.4 Local de Estudo.....</b>	<b>49</b>
<b>4.5 Justificativa da Escolha dos Locais.....</b>	<b>51</b>
<b>4.6 População de estudo.....</b>	<b>51</b>
4.6.1 Critérios de Seleção.....	52
<b>4.7 Técnica de Amostragem.....</b>	<b>53</b>

	23
<b>4.8 Registro e Identificação das Amostras .....</b>	<b>53</b>
<b>4.9 Procedimentos de Coleta .....</b>	<b>54</b>
4.9.1 Equipe de Coleta .....	54
4.9.2 Preparação Prévia .....	56
4.9.3 Coleta de Amostras Biológicas.....	56
<b>5 Avaliação Clínica.....</b>	<b>58</b>
<b>5.1 Avaliação Individual .....</b>	<b>58</b>
5.1.1 Escore Corporal .....	58
5.1.2 Obtenção do Peso Corporal .....	59
5.1.3 Determinação do Sexo.....	60
5.1.4 Método Famacha©.....	60
5.1.4 Avaliação Geral por Pesquisa de Ectoparasitas .....	61
5.1.5 Observações Clínicas Relevantes.....	61
<b>5.2 Questionário.....</b>	<b>62</b>
<b>5.3 Banco de dados .....</b>	<b>62</b>
5.3.1 Data de Coleta.....	63
5.3.2 Código do Brinco .....	63
5.3.3 Local de Coleta.....	64
<b>5.4 Transporte e Armazenamento.....</b>	<b>65</b>
<b>6. Identificação de <i>Coxiella</i> e <i>Rickettsia</i> .....</b>	<b>66</b>
<b>6.1 Metodologia Laboratorial.....</b>	<b>66</b>
6.1.1 Imunofluorescência Indireta (IFI).....	66
6.1.2 Procedimento para Avaliação de Anticorpos Anti- <i>C. burnetii</i> e Anti- <i>Rickettsia</i> em Soros Ovinos por Imunofluorescência Indireta (RIFI)	66
<b>6.2 Preparação do DNA genômico.....</b>	<b>68</b>
6.2.1 Extração de DNA .....	69
6.2.2 Dosagem de DNA pelo Kit de ensaio Qubit™ dsDNA BR .....	70
<b>6.3 Técnicas Moleculares .....</b>	<b>70</b>
6.3.1 PCR Convencional para o Gene Endógeno da Proteína de Ligação aos Retinóides Inter-Fotorreceptores (IRBP).....	71
6.3.2 Procedimento de PCR Convencional para <i>C. burnetii</i> .....	72
6.3.3 Procedimento de PCR Nested para <i>C. burnetii</i> .....	73
6.3.4 Procedimento de PCR convencional para <i>Rickettsia</i> spp. ....	74
6.3.5 Procedimento de PCR convencional para <i>Rickettsia</i> spp. ....	75
6.3.6 Procedimento de PCR Semi-nested para <i>Rickettsia</i> spp. ....	76
<b>6.4 Eletroforese em gel de agarose .....</b>	<b>77</b>
<b>6.5 Controle de Qualidade.....</b>	<b>77</b>
<b>7 RESULTADOS.....</b>	<b>78</b>

	24
<b>7.1 Obtenção das amostras.....</b>	<b>78</b>
<b>7.2 Identificação morfológica.....</b>	<b>78</b>
<b>7.3 Avaliação clínica .....</b>	<b>78</b>
7.3.1 Sexo dos Ovinos .....	78
7.3.2 Distribuição Populacional por Categoria .....	79
7.3.3 Avaliação do Escore Corporal (ECC) dos Ovinos.....	80
7.3.4 Peso Corporal.....	81
7.3.5 Método Famacha©.....	82
7.3.6 Avaliação Geral por Pesquisa de Ectoparasitas .....	83
8.3.7 Observações Clínicas Relevantes.....	84
<b>7.4 Dosagem de DNA pelo Método Qubit.....</b>	<b>84</b>
<b>7.5 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>C. burnetii</i> e <i>R. rickettsii</i>.....</b>	<b>85</b>
<b>7.6 PCR convencional para o IRBP .....</b>	<b>86</b>
<b>7.7 PCR e nested para <i>C. burnetii</i> .....</b>	<b>87</b>
<b>7.8 PCR e Semi-nested para <i>Rickettsia</i> spp. ....</b>	<b>88</b>
<b>7. 9 Atividades realizadas em respostas aos resultados obtidos.....</b>	<b>89</b>
7.9.1 Material de apoio a Vigilância Epidemiologica .....	89
<b>8 DISCUSSÃO .....</b>	<b>90</b>
<b>8.1 Ovinos Pantaneiros e <i>C. burnetii</i>.....</b>	<b>90</b>
<b>8.2 Ovinos Pantaneiros e <i>Rickettsia</i> spp.....</b>	<b>93</b>
<b>9 CONCLUSÕES .....</b>	<b>97</b>
<b>10 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>98</b>
<b>11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>99</b>
<b>12 APÊNDICE.....</b>	<b>106</b>
<b>A - QUESTIONÁRIO.....</b>	<b>106</b>
<b>B - Divulgação em Mídias Sociais Sobre <i>C. burnetii</i>.....</b>	<b>107</b>
<b>13 ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS – CEUA.....</b>	<b>109</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Considerações Gerais

As doenças zoonóticas, ou zoonoses, representam um desafio significativo para a saúde pública, sendo infecções transmitidas dos animais para os seres humanos e causadas por diversos agentes patogênicos, como vírus, parasitas, fungos e bactérias (ELSOHABY; VILLA, 2023).

A transmissão dessas enfermidades ao ser humano ocorre por diferentes vias, incluindo contato direto com animais infectados, vetores artrópodes, consumo de água ou alimentos contaminados, fômites (objetos ou superfícies que podem carregar patógenos), ambientes contaminados e transmissão aérea por meio de gotículas (LOH *et al.*, 2015; RAHMAN *et al.*, 2020).

Essa complexa interação entre humanos, animais e meio ambiente desempenha um papel crucial na disseminação e emergência de novas doenças infecciosas de origem zoonótica (LOTTA *et al.*, 2019).

Cerca de 75% das doenças infecciosas emergentes em humanos estão relacionadas à transmissão de animais vertebrados para humanos, e 60% dos patógenos causadores de doenças em humanos são de origem animal (BIDAISEE; MACPHERSON, 2014).

A abordagem “*One Health*” (saúde única) surge como uma necessidade imperativa para o controle eficaz dessas enfermidades. Essa abordagem multidisciplinar, envolvendo a colaboração entre profissionais da saúde pública, medicina veterinária, gestão animal e ecologia, é essencial para enfrentar os desafios complexos apresentados pelas zoonoses (CUNNINGHAM; DASZAK; WOOD, 2017).

Além disso, as bactérias desempenham um papel preponderante na indução de zoonoses, tanto bactérias gram-negativas quanto gram-positivas sendo responsáveis pela maioria dessas doenças. Animais domésticos e de companhia como cães, gatos e animais de produção como bovinos, ovinos, caprinos, cavalos e porcos, atuam como reservatórios desses patógenos zoonóticos (RAHMAN *et al.*, 2020).

O Brasil possui um importante papel na produção mundial de ovinos,

sendo um dos principais produtores da América do Sul e do mundo. Em 2020, o Brasil contava com um rebanho ovino de aproximadamente 21,5 milhões de cabeças, distribuídas por todo o território nacional com predominância nas regiões Nordeste, Sul e Centro-Oeste (IBGE, 2022).

As ovelhas desempenham um papel significativo na transmissão de zoonoses como febre maculosa e febre Q devido à sua proximidade com os seres humanos e a sua participação na cadeia alimentar (SILVA *et al.*, 2021). Sendo assim a infecção por agentes zoonóticos gera um impacto substancial na saúde e na produtividade dos rebanhos ovinos, resultando em perdas econômicas significativas, que podem afetar diretamente a rentabilidade da atividade pecuária (AZEVEDO *et al.*, 2018).

Dentre as zoonoses mais frequentes associadas a esses animais, destacam-se a Febre Q, causada pela bactéria *C. burnetii*, e a Febre Maculosa, provocada pela *Rickettsia* do grupo da Febre Maculosa (ABDELMOEIN; HAMZA, 2017; BARON, 1996).

Essas enfermidades, além de exemplificar a diversidade das zoonoses, ilustram a necessidade urgente de compreensão e gestão eficaz dessas interações complexas para garantir a saúde pública. Essas zoonoses representam, portanto, um desafio significativo para a pecuária ovina no Brasil, afetando não apenas a saúde e o bem-estar dos animais, mas também a sustentabilidade econômica dos produtores e a segurança alimentar da população (SANTOS *et al.*, 2019; FRANCO *et al.*, 2020).

Uma compreensão aprofundada da prevalência, distribuição e impacto dessas doenças é essencial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção, controle e manejo, visando proteger tanto a saúde dos rebanhos ovinos quanto a saúde pública em geral (AZEVEDO *et al.*, 2018).

Diante do exposto, esta dissertação busca, assim, detectar a possível presença da circulação, e o impacto da *C. burnetii* e *Rickettsia* spp. em ovinos pantaneiros oriundos de dois rebanhos distintos. A abordagem integrada da saúde única torna-se imperativa, envolvendo não apenas aspectos veterinários, mas também considerando a ecologia e a saúde pública. O conhecimento gerado a partir deste estudo contribuirá para a gestão da saúde dos rebanhos ovinos e para o desenvolvimento de estratégias preventivas e de controle, visando proteger a comunidade humana que compartilha o mesmo ambiente.

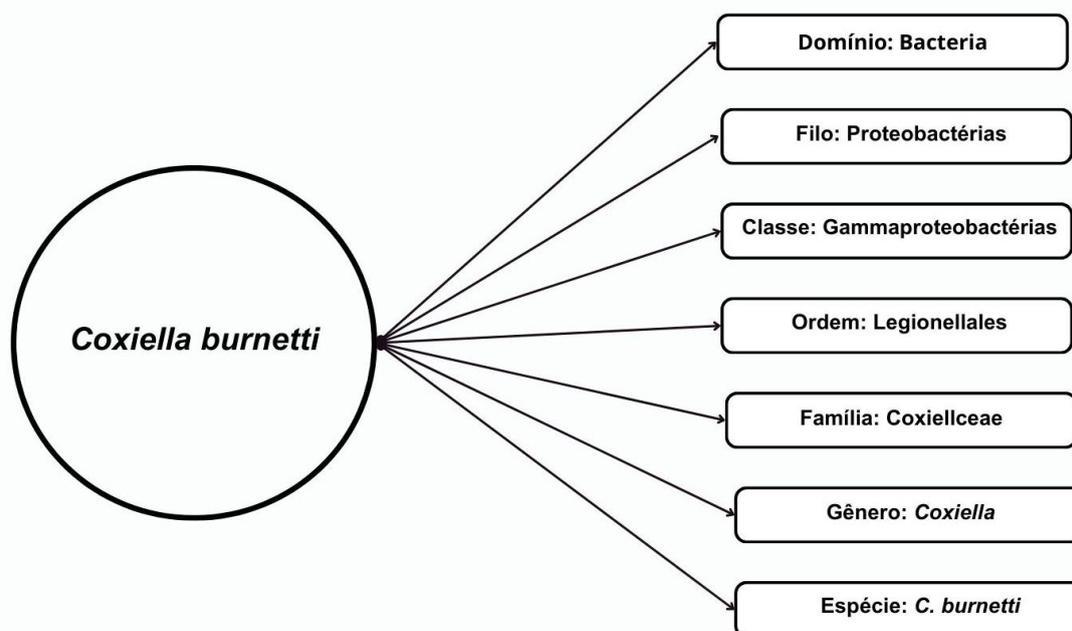
## 2 CONTEXTUALIZAÇÃO

### 2.1 *Coxiella burnetii*

#### 2.1.1 Agente Etiológico

*C. burnetii* é uma bactéria Gram-negativa intracelular obrigatória e pleomórfica, com dimensões de 0,4-1,0 µm de comprimento e 0,2 a 0,5 µm de largura. Ela pertence ao domínio Bactéria, filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Legionellales, família Coxiellaceae, gênero *Coxiella* e espécie *C. burnetii* (Figura 1) (ULLAH et al., 2022).

**Figura 1** – Classificação taxonômica do gênero *C. burnetii*.



Fonte: Autoria própria, adaptado de (ULLAH et al., 2022).

A bactéria apresenta tropismo por fagócitos mononucleares, principalmente macrófagos alveolares, em humanos e animais, onde realiza sua replicação após a internalização na célula hospedeira (ULLAH et al., 2022).

O período de incubação em humanos ocorre de duas a quatro semanas, estando fortemente relacionado à dose e forma de inoculação do patógeno e à fase antigênica (ANDERSON et al., 2013; ULLAH et al., 2022). É importante

destacar que existem duas formas antigênicas, Fase I e Fase II, ambas associadas à presença da molécula de lipopolissacarídeo (LPS). A Fase I, caracterizada como a forma virulenta da *C. burnetii*, apresenta o LPS completo e é isolada em hospedeiros infectados. A Fase II é também virulenta, mas com LPS incompleto, ocorrendo após passagens repetidas da Fase I em culturas celulares (SOUZA *et al.*, 2022).

*C. burnetii* possui duas formas relacionadas ao crescimento, correspondendo a um ciclo de desenvolvimento bifásico. Na fase de replicação exponencial, há a presença de células grandes (LCV), enquanto na fase estacionária (não replicativa), ocorre a presença de células pequenas (SCV). Os SCVs são pequenos bastonetes com aproximadamente 0,5 µm de comprimento, possuindo um envelope espesso e uma membrana interna incomum (ELDIN *et al.*, 2017).

Eles são estáveis no ambiente e resistentes a métodos químicos e térmicos, acredita-se que essa resistência ambiental esteja ligada a múltiplas ligações cruzadas em seu peptidoglicano. As LCVs são maiores que 0,5 µm e morfologicamente semelhantes a outras bactérias gram-negativas (ELDIN *et al.*, 2017).

*C. burnetii* possui uma série de hospedeiros, incluindo aves, mamíferos selvagens, humanos e artrópodes (MAURIN; RAOULT, 1999). No entanto, são os ruminantes como ovinos e caprinos os principais reservatórios desse microrganismo e são considerados como potencial risco de transmissão para humanos, resultando na ocorrência de Febre Q, uma zoonose presente em quase todo o mundo (PEXARA; SOLOMAKOS; GOVARIS, 2018).

### 2.1.2 Transmissão de *C. burnetii*

A principal via de aquisição de *C. burnetii* é a inalação de aerossóis contaminados (TISSOT-DUPONT *et al.*, 2004). Os aerossóis contendo o patógeno se dispersão pelo vento em uma distância de 30 km, contribuindo assim para disseminação da bactéria e ocorrência da doença para locais longes das áreas de contaminação inicial. Em decorrência disso, a febre Q pode ser diagnosticada em pessoas que não tiveram contato recente com animais (MEURER, 2020).

*C. burnetii* pode ser eliminada em diversos fluidos corporais, como leite, fezes, restos placentários, membranas fetais e secreções vaginais de ruminantes. Estas substâncias contêm grande quantidade da bactéria, o que justifica a alta taxa de contaminação por essa via (ULLAH *et al.*, 2022).

Há grande quantidade de bactérias, principalmente em fluidos abortivos pós falha reprodutiva, chegando a 1 bilhão por grama de restos placentários eliminados juntamente com os restos abortivos (HADUSH *et al.*, 2016).

A infecção do animal por *C. burnetii* é, na maioria dos casos, assintomática e o termo coxiellose é considerado uma designação mais apropriada, em comparação com a Febre Q aguda humana (LANG, 1988).

Ovelhas assintomáticas podem conter até mais de  $10^9$  doses. A bactéria é eliminada nos fluidos corporais por um período variável, dependente da espécie hospedeira. Bovinos assintomáticos infectados por *C. burnetii* eliminam o patógeno no leite por longos períodos, tendo essa rota como principal meio de excreção bacteriana, enquanto a eliminação pelo muco vaginal e/ou fezes é esporádica (ULLAH *et al.*, 2022). Já em ovinos, a principal via de eliminação ocorre pelas secreções vaginais e fecais (RODOLAKIS *et al.*, 2007).

A ingestão de alimentos contaminados é considerada uma forma menos comum de transmissão, e a infecção ocorre por consumo de produtos lácteos provenientes de animais contaminados não pasteurizados (MILLER; PRIESTLEY; KERSH, 2021).

A ocorrência de infecção em humanos via picada de pequenos artrópodes, como carrapatos, não está bem definida, no entanto, a transmissão de *Coxiella* de forma transovariana e de geração em geração ocorre de maneira efetiva, tornando os carrapatos um potencial reservatório desses patógenos (CELINA; CERNÝ, 2022).

Além disso, carrapatos infectados excretam grande quantidade de bactérias em suas fezes, chegando a  $10^{10}$  g por fezes em decorrência da multiplicação bacteriana nesse vetor ocorrer em seus intestinos (PHILIP, 1948).

Em decorrência do exposto, o ectoparasitismo contribui para contaminação dos pelos, couros e lãs dos animais (FERREIRA, 2016). Humanos podem se contaminarem ao terem contato direto com esses animais ou após as fezes dos carrapatos secarem e se difundirem ao ar, podendo ser inaladas contribuindo assim para a disseminação da bactéria (ULLAH *et al.*, 2022).

### 2.1.3 Reservatórios de *C. burnetii*

A bactéria *C. burnetii* pode infectar uma gama de hospedeiros sendo esses vertebrados e invertebrados. Além disso, *C. burnetii* também permanece por longos períodos no ambiente em decorrência de sua esporulação (ANGELAKIS; RAOULT, 2010).

Mamíferos como ovinos, caprinos e bovinos são os animais com risco elevado de transmissão, seja por contato direto, por gotículas existentes no ambiente ou por ingestão de produtos lácteos provenientes desses animais uma vez que são utilizados como animais de produção. A problemática em torno desse grande reservatório da bactéria está na identificação e controle da infecção nos ruminantes, pois transmitem a *C. burnetii* mesmo assintomáticos (ELDIN *et al.*, 2017; GALE *et al.*, 2015).

Vacas assintomáticas eliminam em sua maioria a bactéria no leite e acredita-se que a bactéria esteja dentro do vacúolo parasitário de macrófagos presentes no leite em sua forma SVC tornando sua sobrevivência no líquido longa e altamente perigosa à saúde humana devido à sua capacidade também de sobreviver a mecanismos de defesa presente no trato gastrointestinal humano. No entanto, não ocorre multiplicação do patógeno no leite (RODOLAKIS *et al.*, 2007).

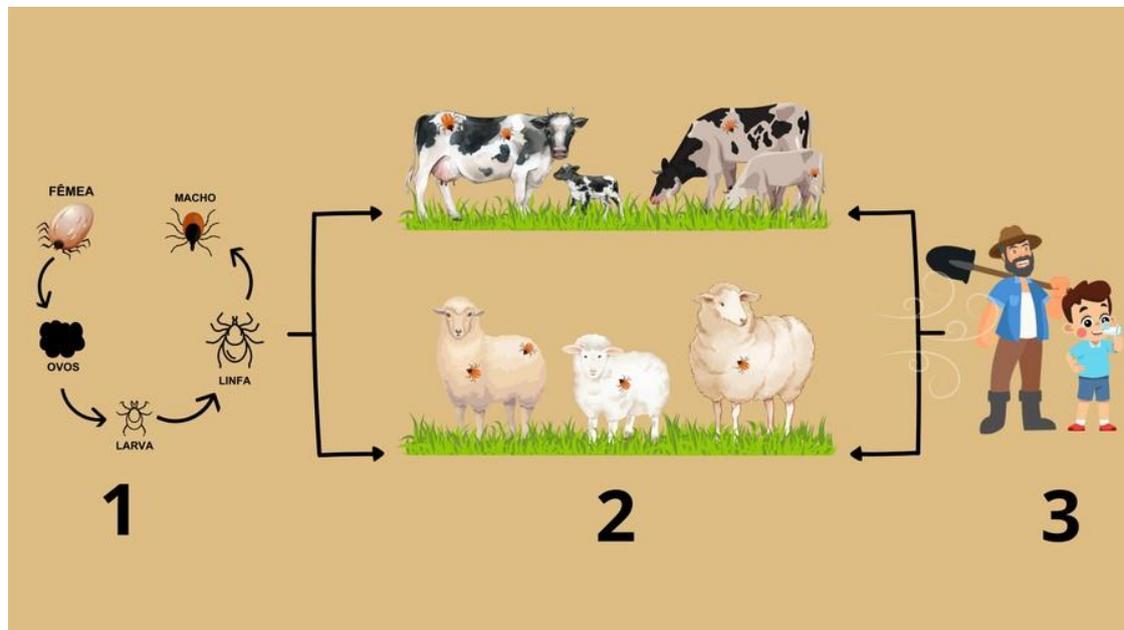
Um estudo comparativo realizado por Rodolakis *et al.*, (2007), demonstrou que entre os ruminantes (ovinos, caprinos e bovinos), os ovinos apresentaram a maior taxa de infecção e eliminação da bactéria no leite, fezes e muco vaginal. Essa disparidade nas vias de eliminação da bactéria sugere que os surtos da infecção estão mais associados aos ruminantes de pequeno porte do que aos rebanhos bovinos.

*C. burnetii* tem a capacidade de infectar células de carrapatos, demonstrando uma notável longevidade com um tempo de sobrevivência de até 200 dias, podendo estender-se até 10 anos, dependendo da espécie específica do carrapato hospedeiro. A bactéria é encontrada abundantemente parasitando células epiteliais e o lúmen do intestino dos carrapatos (ELDIN *et al.*, 2017).

A transmissão transovariana e transestadial da bactéria entre os carrapatos sugere que esses artrópodes podem ser reservatórios do patógeno, contribuindo também para a disseminação de *C. burnetii* e

infectando mamíferos parasitados (Figura 2). Há também relatos de mamíferos marinhos, domésticos, aves e répteis como possíveis reservatórios da bactéria (ELDIN *et al.*, 2017).

**Figura 2** – Ciclo de transmissão da *C. burnetti*.



Legenda: Fase 1 - transmissão transovariana (da fêmea para ovos e larvas) e transestadial (do patógeno, a partir das larvas, para ninfas e destas para os adultos). Fase 2 - transmissão do patógeno durante o repasto sanguíneo no animal. Fase 3 - transmissão do patógeno por aerossóis, fluidos corporais e ingestão de alimentos para humano. Fonte: Autoria própria, adaptado de (ULLAH *et al.*, 2022).

#### 2.1.4 Situação Epidemiológica da *C. burnetii*

A Febre Q trata-se de uma zoonose de distribuição mundial, cuja prevalência varia geograficamente e em decorrência da subnotificação dos casos (SARAIVA, 2022).

Nos Estados Unidos, apenas em 1999 a Febre Q tornou-se uma doença de notificação compulsória, com aumento considerável de casos entre 2000 e 2007 (CDC, 2021).

Na Austrália, onde a zoonose foi inicialmente descrita, ela é considerada doença notificável, embora subnotificada devido a problemas de diagnóstico. No Brasil, a doença não é de notificação compulsória devido a

problemas no diagnóstico e devido a sintomatologia inespecífica (DAMASCENO; GUERRA, 2018; ELDIN *et al.*, 2017).

Endemias ou surtos de Febre Q são mais frequentes em regiões com populações envolvidas em atividades de risco, como agricultores, trabalhadores de frigoríficos e praticantes de turismo rural (LAUTENSCHLÄGER *et al.*, 2000).

França, Estados Unidos e Espanha experimentaram epidemias relacionadas a essas atividades. No Sudeste da França, há focos hiperendêmicos da doença, com incidência de 34,5 casos para cada 100.000 habitantes, devido à inalação de esporos provenientes de rebanhos locais de ovinos (ELDIN *et al.*, 2017).

Entre 2007 e 2010, houve surtos de Febre Q envolvendo cabras leiteiras nos Países Baixos, com pouco mais de 4.000 casos notificados e estimativa de 40.000 casos totais (ELDIN *et al.*, 2017).

No Brasil, a verdadeira prevalência da Febre Q em seus principais reservatórios, os ruminantes, ainda é desconhecida. Em 1955, foi encontrada soropositividade em 14% de vacas leiteiras em São Paulo (MARES-GUIA, 2011; SANTOS; BACELLAR; FRANCA, 2007).

A verdadeira prevalência da Febre Q no país em seus principais reservatórios, os ruminantes, ainda é desconhecida. Em 1955, foi encontrada soropositividade em 14% de vacas leiteiras em São Paulo (VALLE *et al.*, 1955). Em 1975, pesquisadores relataram prevalência de 29% de *C. burnetii* em bovinos de frigoríficos brasileiros (RIEMANN *et al.*, 1975).

Em 2018, um estudo realizado em rebanhos de caprinos com distúrbios reprodutivos relatou soropositividade em 55,1% (DE OLIVEIRA *et al.*, 2018). Também em 2018, no nordeste brasileiro, no estado de Pernambuco, 403 ovinos e 412 caprinos foram testados, apresentando anticorpos *anti-C. burnetii* em 2,1% e 2,2%, respectivamente (SOUZA *et al.*, 2018).

Em 2020, no estado de Goiás, foi identificado o DNA genômico de *C. burnetii* em amostras de bovinos leiteiros e em fetos provenientes do mesmo rebanho (MIONI *et al.*, 2020).

Além do impacto na reprodução dos animais contaminados pela bactéria, associado ao aumento de casos de abortos e baixa fertilidade no rebanho, há também o risco ocupacional para trabalhadores que lidam

diariamente com esses animais de produção (DAMASCENO; GUERRA, 2018).

Em 2015, ocorreu um surto de Febre Q em trabalhadores de um frigorífico de bovinos em São Paulo, no município de Barbosa (FAGUNDES; LABRUNA; UENO, 2018).

Em 2018, houve contaminação por *C. burnetii* de cinco cadetes do programa de treinamento na Academia de Bombeiros Militares Pedro II (MFAPRJ) no Rio de Janeiro, após treinamento envolvendo caprinos. São Paulo e Rio de Janeiro são os estados com maior prevalência de infecção por *C. Burnetii* (DE LEMOS *et al.*, 2018; MIONI *et al.*, 2020). No estado de Mato Grosso do Sul, rico em atividades agropecuárias, com produção e exportação de carnes e produtos lácteos, há escassez de informações quanto à prevalência do patógeno em rebanhos de ruminantes provenientes dessa região do Brasil.

#### 2.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da Febre Q baseado nos sinais e sintomas da infecção é praticamente impossível devido aos casos assintomáticos ou com manifestações clínicas inespecíficas que podem ser confundidas com outras doenças (ANDERSON *et al.*, 2013).

Portanto, torna-se necessária a realização de testes laboratoriais para conclusão diagnóstica definitiva da presença ou ausência da infecção por *C. burnetii* (ULLAH *et al.*, 2022).

Os métodos diagnósticos para o rastreamento da Febre Q incluem a propagação do microrganismo utilizando cultura de células por tempo prolongado de incubação exigindo um laboratório NB-3 para a realização dos procedimentos, testes sorológicos, e moleculares como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (KODORI *et al.*, 2023).

As técnicas sorológicas são consideradas “padrão-ouro” no diagnóstico da Febre Q e são preferíveis para estimar a soroprevalência em animais de rebanho. No entanto, estas técnicas, são questionáveis quanto à prevalência em animais portadores devido à janela imunológica. Assim, a combinação de vários métodos sorológicos e moleculares, como a PCR, é

necessária para confirmar a infecção (ULLAH *et al.*, 2022).

A Imunofluorescência Indireta (IFI), técnica sorológica recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o diagnóstico da Febre Q, é útil para identificar anticorpos das classes IgM, IgG e raramente também a classe IgA durante as fases I e II, permitindo assim a identificação das fases aguda e crônica da Febre Q (FOURNIER; MARRIE; RAOULT, 1998).

O método baseia-se em lâminas revestidas com *C. burnetii* (Fase I e/ou Fase II), nas quais é depositado o soro do paciente com o *Cut-off* (título de positividade inicial) previamente definido. Esse *Cut-off* é determinado com base na população testada. Uma única amostra negativa na IFI não exclui a positividade da doença, pois é um método sorológico que depende da conversão do soro do paciente para resultados positivos. Amostras coletadas antes da conversão sorológica possuem altas chances de resultar em falsos negativos (SANTOS; BACELLAR; FRANCA, 2007).

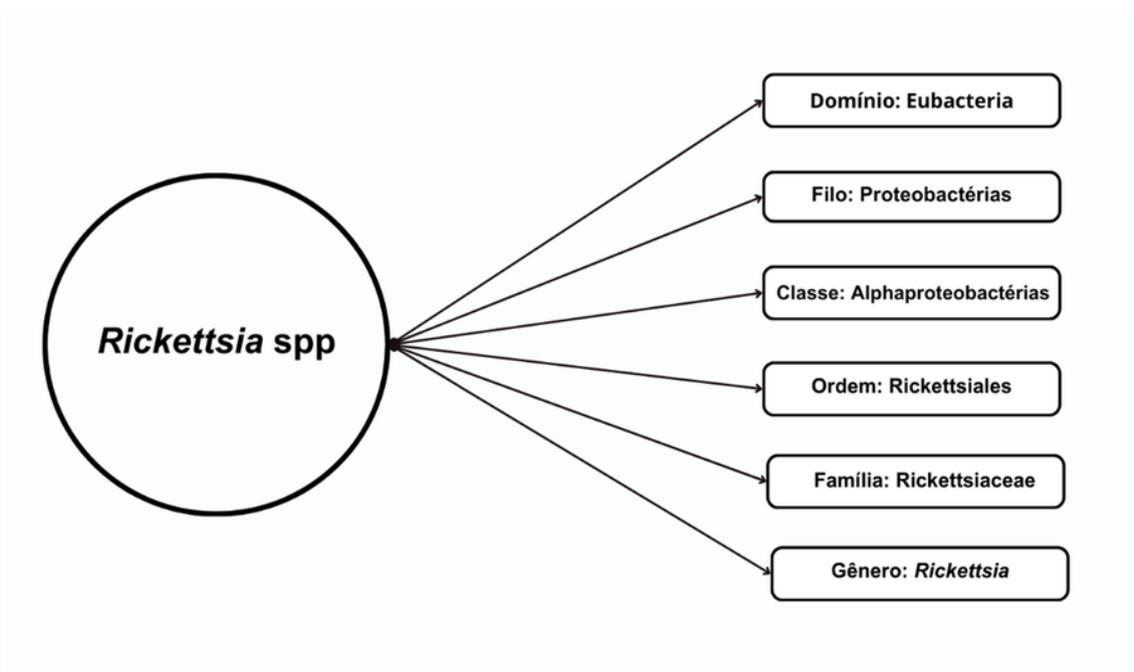
A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é altamente específica no diagnóstico molecular de *C. burnetii*, além de ser um método mais rápido e sensível em comparação com outros (STEIN; RAOULT, 1992). Deve ser realizada juntamente com a IFI para confirmação diagnóstica. A técnica pode ser aplicada a uma variedade de amostras biológicas, como fluidos fetais, amostras de tecidos abortivos, sangue, leite, soro, entre outros (ULLAH *et al.*, 2022).

## 2.2 *Rickettsia* spp.

### 2.2.1 Agente Etiológico

*Rickettsias* são bactérias Gram-negativas, cocobacilos curtos (0,3 a 0,5 por 0,8 a 2,0  $\mu\text{m}$ ), intracelulares obrigatórias, encontradas tanto no citoplasma quanto no núcleo celular. Elas pertencem à Ordem Eubacteria, Filo Proteobactérias, Classe Alphaproteobactérias, Ordem Rickettsiales, Família Rickettsiaceae e Gênero *Rickettsia* (Figura 3) (DUARTE, 2019).

**Figura 3** – Ordem taxonômica de *Rickettsia* spp.



Fonte: Autoria própria, adaptado de (DUARTE, 2019).

Esses microrganismos têm preferência por colonizar glândulas salivares e ovários de artrópodes hematófagos, como carrapatos, ácaros, pulgas e piolhos, além de mamíferos, que servem como hospedeiros (KIM, 2022).

Sua parede microbiana apresenta composições semelhantes a outras bactérias gram-negativas, incluindo lipopolissacarídeo, peptidoglicano, lipoproteína de 17kb, proteína de membrana externa de 135 kDa e proteínas de

membrana específicas, como OmpA e OmpB, que conferem características sorológicas e antigênicas específicas para identificação (GAVA; BRAGA; LANGONI, 2022).

Até a década de 1980, o termo “*Rickettsia*” era utilizado para descrever pequenas bactérias com características intracelulares. No entanto, com o avanço das técnicas moleculares e do conhecimento genômico, definiu-se que o termo se aplica apenas às bactérias do gênero *Rickettsia* transmitidas por artrópodes (FERREIRA, 2016).

O gênero *Rickettsia* é dividido em quatro grupos de acordo com seus hospedeiros artrópodes, bem como características moleculares e antigênicas do patógeno. Esses grupos incluem o Grupo do Tifo (GT), o Grupo da Febre Maculosa (GMF), o Grupo Transicional (GTR) e o Grupo Ancestral (GA), compostos por *Rickettsias* que não se enquadram nos grupos anteriores (GAVA; BRAGA; LANGONI, 2022; MONTEIRO, 2019).

### 2.2.2 Grupo da Febre Maculosa (GMF)

Considerado o grupo mais numeroso, incluindo mais de 20 espécies de *Rickettsias*, das quais 16 são descritas como patógenos humanos, incluindo *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. rhipicephali*, *R. amblyommii* e *R. amblyommatis*. Esse grupo, muitas vezes negligenciado, é responsável por emergências de doenças zoonóticas em todo o mundo. Seus principais vetores são pulgas, carrapatos e ácaros, parasitando animais silvestres como hospedeiros definitivos e, ocasionalmente, humanos e animais domésticos (COHEN *et al.*, 2021; ROBINSON *et al.*, 2019).

*R. rickettsii* é a espécie de maior importância do grupo, relatada pela primeira vez em 1899 nas regiões montanhosas dos Estados Unidos da América (EUA), sendo responsável pela doença conhecida como Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (PAROLA; PADDOCK; RAOULT, 2005).

Em 1909, Howard Taylor Ricketts fez o primeiro isolamento da bactéria no carrapato *Dermacentor andersoni*, estabelecendo o papel crucial desse artrópode na transmissão de *R. Rickettsii*, que recebeu o nome em sua homenagem (RICKETTS, 1906).

No Brasil, *R. rickettsii* é responsável por causar a Febre Maculosa

Brasileira (FMB), sendo a principal espécie do grupo a infectar seres humanos a partir de seus vetores e reservatórios zoonóticos (MONTEIRO, 2019).

### 2.2.3 Febre Maculosa Brasileira

A FMB é uma doença infecciosa febril aguda grave causada pela bactéria *R. rickettsii*, transmitida aos humanos por meio da picada de carrapatos *Amblyomma sculptum* contaminados (SALVIANO *et al.*, 2023).

Os principais hospedeiros amplificadores dessa bactéria são as capivaras da espécie *Hydrochoerus hydrochaeris* (ROCHA *et al.*, 2017). No Brasil, há relatos desta doença desde 1920, e ela apresenta características vetoriais e genéticas distintas da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas, que ocorre na América do Norte (SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013).

A FMB é endêmica na maior parte do sudeste brasileiro, com casos registrados nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Paraná e especialmente em São Paulo. Entre os anos de 2001 e 2018, o estado de São Paulo registrou aproximadamente 978 casos confirmados, dos quais 50% (489) resultaram em óbito (LUZ *et al.*, 2019; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013).

### 2.2.4 Transmissão

A transmissão da *Rickettsia rickettsii* está associada a carrapatos *ixodídeos* do gênero *Amblyomma*, que têm como principal reservatório mamíferos, principalmente capivaras da espécie *Hydrochoerus hydrochaeris* (FERREIRA, 2016; LUZ *et al.*, 2019).

Esses carrapatos atuam como hospedeiros naturais e vetores de *R. rickettsii*, sendo responsáveis pela manutenção do patógeno na natureza ao contaminar animais vertebrados (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016).

No ciclo de *R. rickettsii* nos carrapatos, inicia-se no trato digestivo, onde a bactéria realiza sua replicação parasitando diversas estruturas, como glândulas salivares, intestinos, hemolinfa, ovários e túbulos de Malpighi (DUARTE, 2019).

A transmissão entre as espécies pode ocorrer de forma transovariana,

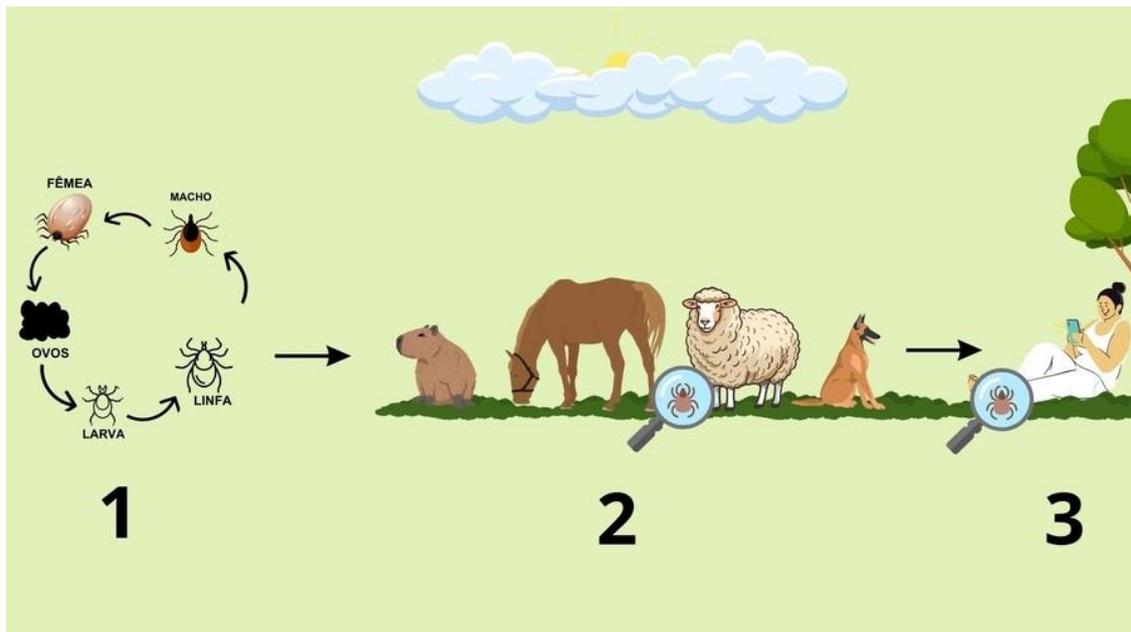
transestadial e através do acasalamento, onde o macho transfere a bactéria para a fêmea por meio do espermatozóide (FERREIRA, 2016; MONTEIRO, 2019). O ciclo biológico do patógeno continua quando esses carrapatos infectados realizam o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero na natureza (GAVA; BRAGA; LANGONI, 2022).

*Rickettsias* estão presentes na saliva do carrapato e são inoculadas na derme no momento da picada, disseminando-se através da circulação linfática e capilares sanguíneos. A bactéria atinge vários órgãos, incluindo pele, trato gastrointestinal, fígado, pâncreas, baço, cérebro, pulmões e coração. Uma vez nos tecidos, a bactéria acomete o endotélio vascular, ligando-se aos receptores de colesterol e fixando-se por meio de suas proteínas específicas, OmpA e OmpB, induzindo a fagocitose para dentro do interior da célula, onde realiza sua replicação, que dura cerca de 10 minutos e ocorre por fissão binária (KIM, 2022; MONTEIRO, 2019).

Os seres humanos se infectam ao terem contato com carrapatos contaminados durante atividades recreativas ou ocupacionais por um período mínimo de parasitismo de 10 minutos (GAVA; BRAGA; LANGONI, 2022; SARAIVA, 2022).

Os humanos atuam como hospedeiros ocasionais e se infectam de maneira acidental em decorrência da bactéria não se multiplicar corretamente no endotélio humano, não desempenhando assim papel na transmissão ou manutenção de *Rickettsia* na natureza (FERREIRA, 2016; WALKER, 1989), conforme figura 4.

**Figura 4** – Ciclo de transmissão da *R. Rickettsii*.



Legenda: Fase 1 - transmissão transovariana (da fêmea para ovos e larvas) e transestadial (do patógeno, a partir das larvas, para ninfas e destas para os adultos, através do acasalamento). Fase 2 – Transmissão do patógeno durante o repasto sanguíneo no animal. Fase 3 – Transmissão do patógeno durante o repasto sanguíneo no humano. Fonte: Autoria própria, adaptado de (ULLAH *et al.*, 2022).

### 2.2.5 Vetores

Os vetores da FMB são os carrapatos *Ixodidae* do gênero *Amblyomma*, com a espécie *A. sculptum* sendo considerada durante muito tempo o vetor primário de *R. Rickettsii*, bactéria causadora da FMB (LABRUNA, 2009).

No entanto, estudos biológicos, morfológicos e moleculares revelaram que *A. cajennense* é na verdade um complexo de seis espécies com distribuição geográfica distinta, incluindo *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma tonelliae*, *Amblyomma patinoi*, *Amblyomma mixtum*, *Amblyomma interandinum* e *A. cajennense sensu stricto* (s.s.) (NAVA *et al.*, 2014). No Brasil, três espécies são responsáveis pela transmissão da FBM: *A. sculptum*, *A. aureolatum* e *A. ovale* (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016).

*A. sculptum* é considerado o principal vetor da FMB com ampla distribuição geográfica na América do Sul, é encontrado preferencialmente

em florestas tropicais e subtropicais úmidas. Seus principais hospedeiros incluem cavalos, antas e capivaras, mas também parasita uma variedade de animais e seres humanos (CARDOSO *et al.*, 2023).

Suas larvas e ninfas, devido ao tamanho pequeno, são especialmente preocupantes, pois podem passar despercebidas ficando aderido por tempo suficiente contribuindo assim para a transmissão da bactéria (MONTEIRO, 2019).

*A. ovale* está predominantemente presente na América Central e do Sul, parasitando mamíferos e aves na fase larval e canídeos na fase adulta. Associado à *R. parkeri* cepa Mata Atlântica, é uma das espécies envolvidas na transmissão da FBM, especialmente nas regiões do Sul, Sudeste, Nordeste e Norte no Brasil (SÁNCHEZ-MONTES *et al.*, 2019; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013)

Já o *A. aureolatum*, conhecido como "carrapato amarelo do cão", é encontrado em áreas úmidas com temperaturas frias na América do Sul. Alimenta-se de espécies carnívoras selvagens, roedores e parasita diversos animais, incluindo humanos. Apresenta maior suscetibilidade à infecção por *R. rickettsii*, especialmente quando cães domésticos são picados em áreas de florestas tropicais (SÁNCHEZ-MONTES *et al.*, 2019; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013).

No estado de Mato Grosso do Sul, há presença de carrapatos das espécies *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *R. sanguineus*, *Demacentor nitens* e *A. cajennense* sendo a mais prevalente parasitando animais silvestres e domésticos presentes no cerrado sul mato-grossense (GARCIA *et al.*, 2013). Há também relatos de *A. cajennense*, *A. parvum* e *Ornithodoros rostratus* parasitando porcos selvagens no estado (CANÇADO *et al.*, 2013).

#### 2.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico FMB é frequentemente desafiador devido aos sintomas inespecíficos da doença que podem ser confundidos com outras doenças como dengue, hepatite e malária, por exemplo (GAVA; BRAGA; LANGONI, 2022).

Geralmente, o diagnóstico é iniciado com a coleta de informações

sobre a sintomatologia do paciente e possíveis exposições aos fatores de risco para o contágio da FMB. Em seguida, são realizados exames laboratoriais, como a Imunofluorescência Indireta (IFI), considerada o padrão ouro para o diagnóstico de rickettsioses, e um exame molecular complementar, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (ABDELMOEIN; HAMZA, 2017; MONTEIRO, 2019).

Além disso, outros exames laboratoriais podem ser úteis na detecção do patógeno, incluindo a imuno-histoquímica realizada com materiais provenientes de biópsias ou de necropsia, bem como técnicas microbiológicas de cultura e isolamento da bactéria, que exigem profissionais qualificados e laboratórios de biossegurança nível 3 (FERREIRA, 2016; MONTEIRO, 2019; MUCHON *et al.*, 2021).

Definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como o “padrão-ouro” no diagnóstico de doenças causadas por *Rickettsias* e preconizada pelo Ministério da Saúde Brasileiro, a Imunofluorescência Indireta (IFI) é uma técnica na qual amostras de soro são utilizadas para detectar anticorpos das classes IgM e IgG, sendo útil para diagnosticar a doença em suas fases aguda e crônica (MONTEIRO, 2019).

O princípio da técnica consiste em lâminas contendo antígenos de *Rickettsia* spp., onde a amostra do paciente é depositada, seguida pela adição de um conjugado marcado com fluoresceína para detecção da ligação antígeno-anticorpo, quando presente. A visualização da ligação é realizada através de microscópio de imunofluorescência (BLANTON, 2019).

A IFI possui sensibilidade de 84,6 a 100% e especificidade de 99,8% a 100% (ARAÚJO *et al.*, 2016). A presença de IgM na IFI é uma forte evidência da doença, porém o método pode apresentar reações cruzadas com outras bactérias não patogênicas pertencentes ao grupo (GALVÃO *et al.*, 2005). Portanto, para concluir o diagnóstico de FMB com IFI, é necessário analisar amostras pareadas, observando um aumento de pelo menos quatro vezes na titulação das imunoglobulinas (MUCHON *et al.*, 2021).

A amplificação de ácidos nucleicos que ocorre na técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma ótima alternativa para o diagnóstico da FMB, devido à descrição detalhada de seus genomas, o que permite a detecção de genes como a citrato sintase (*gltA*), proteína de membrana

externa A (ompA) e proteína de membrana externa B (ompB) (GUEDES *et al.*, 2011).

Além disso, a PCR pode ser realizada no início dos sintomas da doença, sem depender da soroconversão, sendo assim complementar à IFI no diagnóstico definitivo, especialmente útil em casos graves que podem evoluir para óbito (ABDAD *et al.*, 2018; FERREIRA, 2016).

A PCR é um teste rápido, empregado no diagnóstico de animais, vetores e humanos, porém possui especificidade variável e sensibilidade dependente da amostra utilizada para testagem (Muchon *et al.*, 2021; CRUZ, 2016). Para realizar a técnica de PCR, seja convencional ou qPCR, podem ser utilizadas amostras de sangue total, material de escarro ou amostras de biópsia e camada leucocitária (ABDAD *et al.*, 2018).

#### 2.2.7 Situação Epidemiológica da Febre Maculosa Brasileira

*R. rickettsii*, foi descrita no Brasil pela primeira vez em 1900 pelo Dr. Adolfo Lutz. No entanto, somente em 1932, foram registrados relatos da incidência da bactéria em humanos, no estado de São Paulo, sendo denominada “tifo exantemático” (MONTEIRO, 2019). Já entre 1957 e 1974, os casos de FMB aumentaram apresentando 53 casos e 10 casos entre os anos de 1976 e 1982, ambos localizados no estado de São Paulo (NASCIMENTO, 2010).

Em 2001, a Portaria Nº 1.943 definiu a FMB como uma doença de notificação compulsória em todo o território nacional, resultando em uma expansão dos casos notificados pelo Brasil, incluindo estados como Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia e Santa Catarina (BARCI, 2005). Em 2005, foram notificados casos nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Distrito Federal. Já em 2018, os estados de Mato Grosso do Sul, Piauí, Ceará e Goiás também registraram casos da doença (MONTEIRO, 2019)

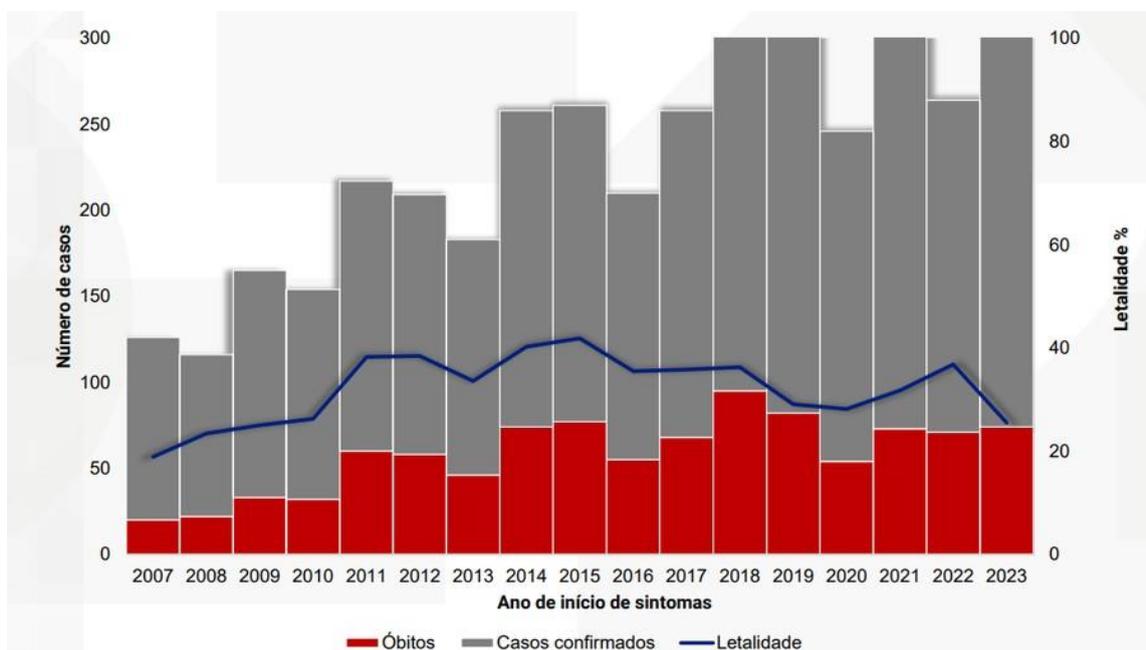
Entre os anos de 2007 e 2024, foram notificados mais de três mil (3.000) casos de FMB no país, sendo 1.963 deles registrados apenas na região Sudeste. Essa concentração de casos na região ocorre devido à segregação dos vetores e reservatórios da bactéria (BRASIL, 2024).

No mesmo período, a região Sul notificou 709 casos, o Nordeste notificou 70 casos e o Norte 21 casos da doença. No Centro-Oeste do país, entre

2007 e 2024, foram 36 casos confirmados e o estado Mato Grosso do Sul relatou 07, seguido de 17 em Goiás e 12 em Mato Grosso (BRASIL, 2024).

A mortalidade por FMB é de 40% (Figura 5), decorrente da sintomatologia inespecífica da doença, diagnóstico tardio e tratamento inadequado. Entre os anos de 2007 e 2024, foram confirmados cerca de 1.002 óbitos. A região Sudeste registrou o maior número de mortes pela doença, totalizando 874, seguida de 07 na região Sul (BRASIL, 2024).

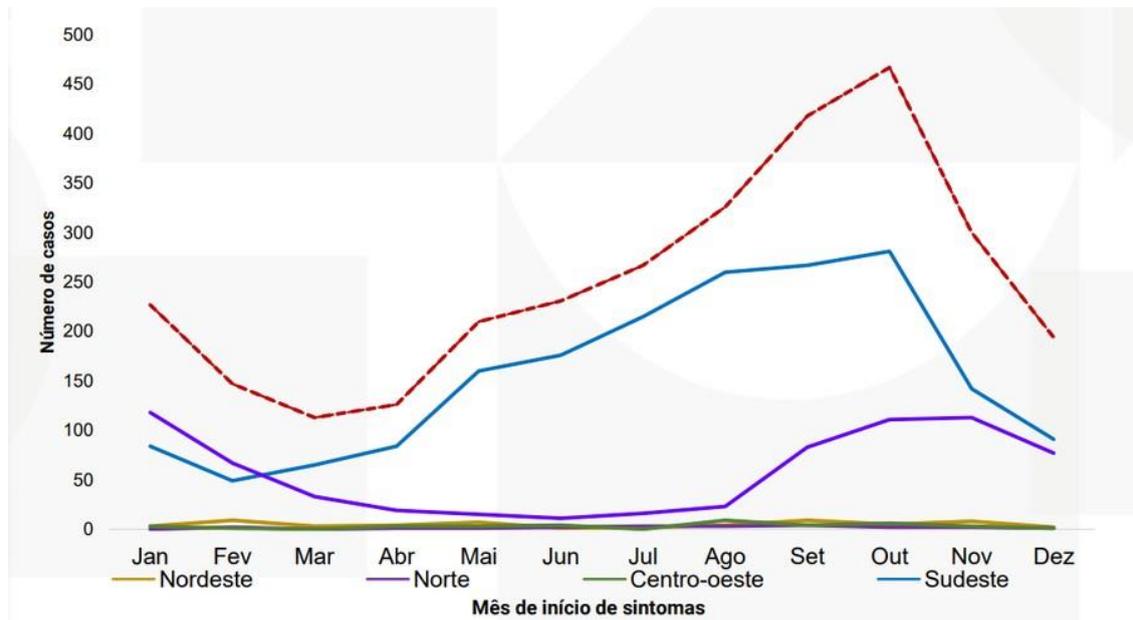
**Figura 5** – Casos confirmados, óbito e letalidade de febre maculosa por ano de início de sintomas, Brasil, 2007 - 2023.



Fonte: (BRASIL, 2024).

Casos de FMB podem ocorrer em qualquer época do ano; no entanto, o aumento dos casos ocorre entre maio e outubro (Figura 6), estando diretamente ligado ao aumento da atividade reprodutiva dos carrapatos, à maior circulação das ninfas e fases larvais e ao maior contato com o ser humano desse vetor, responsável pela manutenção da bactéria na natureza (BRASIL, 2024; 2022).

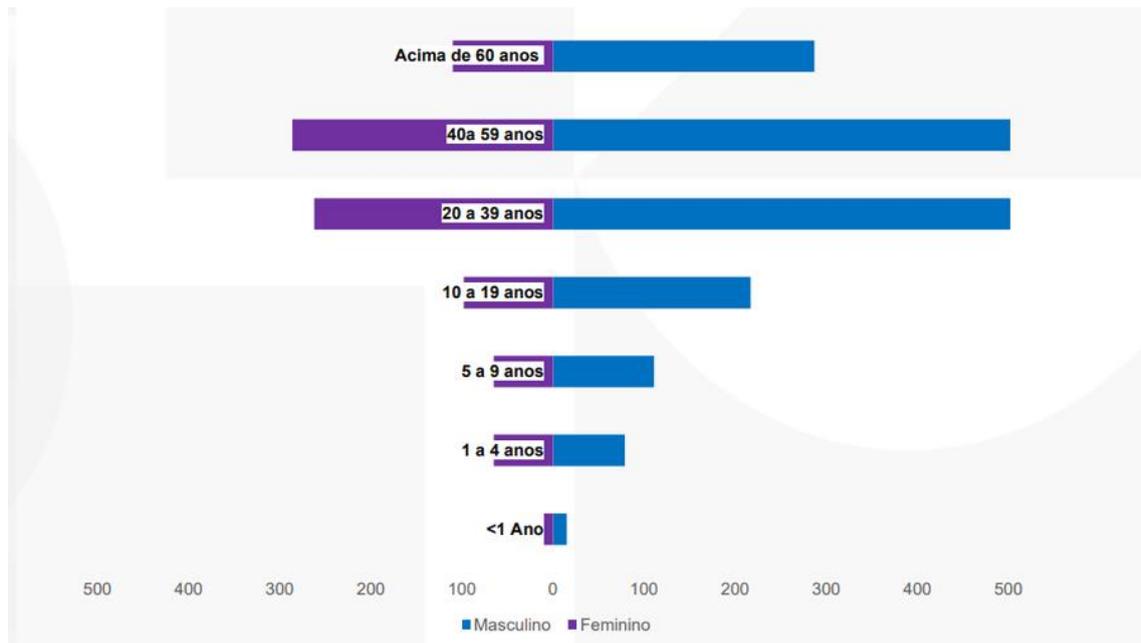
**Figura 6** – Casos de febre maculosa por região e mês de início de sintomas, Brasil, 2007 - 2023.



Fonte: (BRASIL, 2024).

Na figura 7 é apresentado os casos confirmados de febre maculosa por idade e sexo no Brasil entre 2007 e 2023. É possível observar que a doença afeta ambos os sexos e todas as faixas etárias, mas há uma concentração significativa entre os homens nas faixas etárias de 20 a 39 anos e de 40 a 59 anos. Essa tendência pode estar relacionada às atividades desempenhadas pelos homens nesses grupos etários, como trabalho no campo, pecuária, ecoturismo e atividades de lazer, principalmente nas áreas habitadas por capivaras (BRASIL, 2024).

**Figura 7** – Casos confirmados febre maculosa por idade e sexo, Brasil, 2007- 2023.



Fonte: (BRASIL, 2024).

### 2.3 Ovinos Pantaneiros

O Brasil abriga uma diversidade de animais domésticos que evoluíram a partir de raças trazidas pelos portugueses durante o período do descobrimento, como os ovinos, que eram utilizados como fonte de alimentação e para a produção de lã (MARIANTE *et al.*, 1999; COSTA *et al.*, 2013).

Os ovinos pantaneiros foram introduzidos na região há três séculos, originários da Bacia do Rio da Prata e do Paraguai (FERNANDES *et al.*, 2013). Trata-se de uma raça resultante de anos de seleção natural, vivendo sob mínima influência humana, sem controle sanitário ou reprodutivo, adquirindo assim características únicas para a sobrevivência no bioma pantaneiro (JUNIOR *et al.*, 2011). Compartilham o ambiente com animais de vida livre, incluindo seus predadores, como a onça parda, onça pintada, jaguatiricas, cães domésticos, sucuris e jacarés (JUNIOR *et al.*, 2011).

Esses animais adquiriram importantes características adaptativas e de produção devido ao clima alagado do Pantanal Sul, como tolerância ao calor e resistência parasitária que justificam a sua conservação (FRAZILIO, 2005). Esta raça se reproduz em qualquer época do ano, não apresentando estacionalidade reprodutiva (MARTINS *et al.*, 2008). Além disso, os ovinos pantaneiros são animais que exibem uma variedade de características, produzindo carne, leite e lã, com resultados superiores quando comparados com raças de ovinos exóticas (REIS *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2013).

Pouco se sabe sobre a sanidade desses animais. As infecções por nematódeos parasitas de ovinos, é considerada o principal problema sanitário, determinando importantes perdas econômicas pela redução na produtividade e aumento da mortalidade dos animais (COSTA *et al.*, 2013).

No estado de Mato Grosso do Sul, até o momento, não há relatos específicos sobre ovinos pantaneiros associados às bactérias dos gêneros *Coxiella* e *Rickettsia*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 *Objetivo Geral*

Investigar a ocorrência da infecção por *C. burnetii* e *Rickettsia* spp. em dois rebanhos de ovinos pantaneiros dos municípios de Campo Grande e Terenos, Mato Grosso do Sul, Brasil.

#### 3.2 *Objetivos Específicos*

- Detectar a possível presença de anticorpos *anti-C. burnetii.*, e *anti-R. Rickettsii*, em amostras de soro de ovinos da raça Pantaneira, utilizando o teste de imunofluorescência indireta;
- Investigar a possível presença do DNA de *C. burnetii* e *R. rickettsii* em amostras de sangue de ovinos da raça Pantaneira, utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR);
- Fornecer informações sobre a circulação de *C. burnetii* em ovinos para vigilância epidemiológica desta zoonose.
- Realizar avaliação clínica dos ovinos presentes nos rebanhos de estudo.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Desenho do Estudo**

O presente estudo adota uma abordagem epidemiológica transversal e descritiva, com o objetivo de investigar a presença de bactérias pertencentes aos gêneros *Coxiella* e *Rickettsia* em amostras biológicas de ovinos pantaneiros. As amostras foram coletadas em duas localidades: no Centro Tecnológico de Ovinos (CTO) da Universidade Anhanguera - UNIDERP e na EMBRAPA Gado de Corte no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil.

### **4.2 Considerações Éticas**

Este estudo foi conduzido em conformidade com as normas éticas estabelecidas e recebeu aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Anhanguera-UNIDERP, sob o protocolo n. 3119/2020. O respeito aos princípios éticos foi uma prioridade durante todas as fases deste projeto de pesquisa (Anexo A).

#### **4.2.1 Consentimento Informado**

Dado que este estudo envolveu a coleta de amostras de ovinos, foi garantido o respeito aos princípios de consentimento informado, conforme estabelecido pelo CEUA. Todos os procedimentos foram realizados considerando o bem-estar dos animais, e as amostras foram coletadas de acordo com práticas éticas de manejo animal.

#### **4.2.2 Confidencialidade**

As informações relacionadas às amostras e resultados obtidos foram tratadas com a devida confidencialidade. A identificação das amostras e dados dos animais foi mantida em sigilo para preservar a privacidade dos envolvidos e garantir a integridade ética da pesquisa.

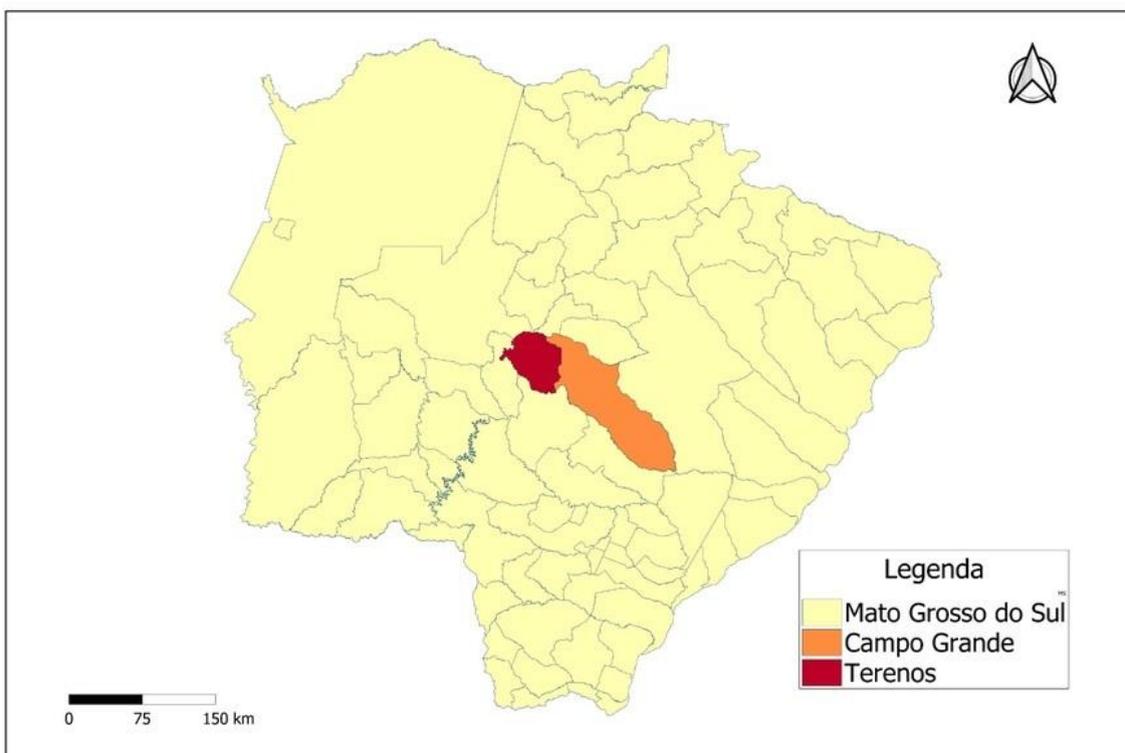
### 4.3 Manipulação de Amostras

A manipulação das amostras para análise de técnicas moleculares foi conduzida em instalações de biossegurança localizadas na Universidade Anhanguera-UNIDERP, Mato Grosso do Sul. Essas instalações são equipadas de acordo com os padrões de segurança necessários para lidar com material biológico potencialmente infeccioso, assegurando a segurança dos pesquisadores e a integridade dos resultados.

### 4.4 Local de Estudo

As amostras para o estudo foram coletadas em dois criatórios distintos em Mato Grosso do Sul, sendo Campo Grande com 158 amostras e Terenos 129 amostras (figura 8).

**Figura 8** – Mapa do estado de Mato Grosso do Sul, Cidades, Campo Grande e Terenos.

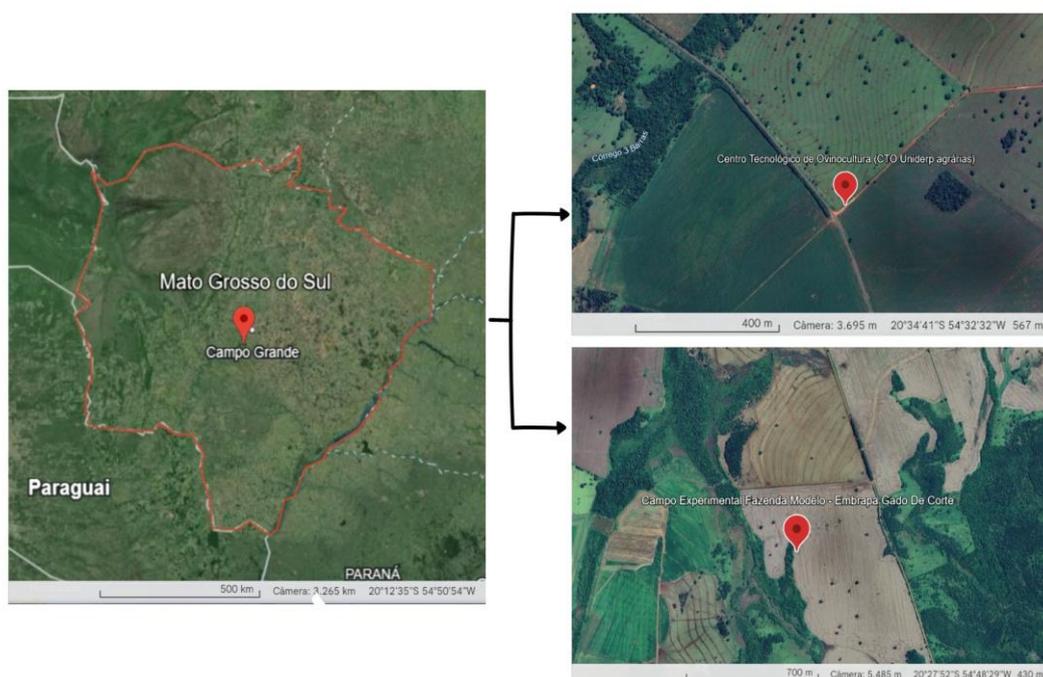


Fonte: Autoria própria, QGIS e IBGE, (2024).

O Centro Tecnológico de Ovinocultura (CTO) da Fundação Manoel de Barros, mantidos na Fazenda Escola Três Barras da Universidade Anhanguera – UNIDERP (coordenadas  $20^{\circ}33'33,77''$  S e  $54^{\circ}32'25,04''$ W), localizado em Campo Grande, desempenha um papel crucial neste estudo. Reconhecido por seu compromisso com a excelência na pesquisa e desenvolvimento na área de ovinocultura, o CTO possui uma infraestrutura moderna, incluindo instalações de manejo de animais e laboratórios especializados, proporcionando condições ideais para a realização de estudos epidemiológicos de alta qualidade.

A presença da EMBRAPA Gado de Corte de Mato Grosso do Sul também é fundamental para o estudo. Com sede em Campo Grande, a instituição concentra especialistas, laboratórios e recursos essenciais para a pesquisa agropecuária, promovendo uma abordagem integrada na busca por soluções inovadoras. Além disso, a Fazenda Modelo em Terenos (coordenadas  $20^{\circ}33'10,9''$ S  $54^{\circ}48'48,8''$ W), onde as amostras foram coletadas, representa um importante campo experimental da EMBRAPA, oferecendo condições controladas e realistas para a condução de pesquisas aplicadas à pecuária na região (Figura 9).

**Figura 9** – Representação do estado de Mato Grosso do Sul e CTO e EMBRAPA.



Fonte: Autoria própria, Google Earth, (2024).

Em ambos locais, CTO e EMBRAPA, as amostras foram realizadas em centros de manejo especialmente designados para garantir condições seguras e adequadas durante o processo de coleta. Esses ambientes foram cuidadosamente planejados para minimizar o estresse nos animais e preservar a qualidade das amostras.

#### ***4.5 Justificativa da Escolha dos Locais***

A escolha estratégica dos locais de estudo baseou-se na expertise técnica disponível nessas instituições, assim como na representatividade dos ovinos pantaneiros na região. O CTO, com seu foco específico em ovinocultura, proporciona uma perspectiva valiosa para a pesquisa, enquanto a EMBRAPA Gado de Corte, com sua abordagem abrangente à pesquisa agropecuária, oferece uma visão mais ampla do contexto regional.

#### ***4.6 População de estudo***

A população de estudo consistiu em todos os ovinos pantaneiros presentes nas instalações designadas para pesquisa devido a coleta ser realizada por demanda espontânea. (Figura 10).

**Figura 10** – Rebanho de ovinos da raça pantaneira.



Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

#### 4.6.1 Critérios de Seleção

Todos os animais presentes em cada localização foram incluídos na amostragem, garantindo uma representação abrangente da população. Os critérios de seleção foram baseados na disponibilidade dos ovinos e não envolveram exclusões específicas. Todos os ovinos foram submetidos à coleta de amostras de soro e sangue EDTA, além de uma avaliação detalhada através do preenchimento de um questionário.

Para a realização da pesquisa, foram coletados dados de todos os indivíduos, filhotes e adultos, pertencentes aos rebanhos do CTO e da EMBRAPA. Esta abordagem foi selecionada devido à singularidade desses rebanhos, compostos por ovinos pantaneiros criados no município de Campo Grande.

Esses animais representam rebanhos provenientes de diversas regiões do Pantanal do Mato Grosso do Sul, incluindo os municípios de São Gabriel

D'Oeste, Coxim, Rio Verde, Aquidauana, Rio Negro, Miranda e Corumbá.

Dessa forma, a amostra é caracterizada por uma ampla diversidade de animais oriundos de diferentes localidades pantaneiras, proporcionando uma representação abrangente das condições e características da região.

#### ***4.7 Técnica de Amostragem***

A coleta de amostras foi realizada pela autora deste projeto de dissertação de mestrado, juntamente com veterinários de ambas as instituições. Esse cuidado assegurou uma execução precisa dos procedimentos e a integridade das amostras. A amostragem incluiu ovinos pantaneiros, e as amostras biológicas foram obtidas a partir de soro e sangue EDTA. Simultaneamente, cada animal foi submetido à avaliação através do preenchimento de um questionário que incluiu dados como sexo, escore corporal, método Famacha<sup>®</sup>, peso e observações clínicas relevantes. Foram coletadas 287 amostras (129 do CTO e 158 da EMBRAPA) no mês de Setembro de 2021 por amostragem por conveniência não probabilística.

#### ***4.8 Registro e Identificação das Amostras***

Cada amostra foi devidamente identificada no tubo de coleta e registrada na planilha de dados, garantindo a rastreabilidade ao longo do processo (Figura 11). Essas precauções visaram a integridade dos dados e a confiabilidade das análises subsequentes.

**Figura 11** – Identificação de amostras de soro para armazenamento



Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

#### **4.9 Procedimentos de Coleta**

A coleta de amostras foi conduzida meticulosamente para garantir a qualidade e representatividade dos dados. Os procedimentos foram realizados de acordo com protocolos padronizados estabelecidos para a investigação epidemiológica de ovinos pantaneiros.

##### **4.9.1 Equipe de Coleta**

A equipe responsável pelos procedimentos de coleta incluiu a autora deste projeto de dissertação de mestrado e veterinários das instituições participantes. A experiência combinada da equipe assegurou uma execução precisa e cuidadosa de todas as fases da coleta (Figura 12 e 13).

**Figura 12** – Equipe na Embrapa envolvida na coleta, separando amostras para transporte e armazenamento.



Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

**Figura 13** – Equipe no Centro Tecnológico de Ovinos (CTO) após preenchimento de questionário e coleta de amostras.



Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

#### 4.9.2 Preparação Prévia

Antes da coleta, a equipe revisou e familiarizou-se com os protocolos de manejo de ovinos, garantindo o bem-estar dos animais durante o processo. A preparação envolveu a utilização de tubos de coleta de sangue, seringas e agulhas estéreis, devidamente preparadas e identificadas para minimizar qualquer risco de contaminação, assegurando uma coleta eficiente e segura (Figura 14).

**Figura 14** – Amostras de ovinos, identificadas e separadas.



Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

Os tubos de coleta de sangue foram escolhidos especificamente para preservar a integridade celular durante o processo, enquanto seringas e agulhas estéreis foram utilizadas para garantir a pureza das amostras. Todos os materiais foram devidamente identificados, contribuindo para uma rastreabilidade eficaz das amostras coletadas.

Essa fase de preparação prévia foi crucial para estabelecer as condições ideais para a coleta de amostras, respeitando os padrões éticos e científicos necessários para o sucesso do estudo.

#### 4.9.3 Coleta de Amostras Biológicas

A coleta de amostras biológicas consistiu na obtenção de sangue e soro

dos ovinos. A punção venosa foi realizada por profissionais treinados, garantindo a obtenção de amostras de alta qualidade. O sangue foi coletado em tubos contendo EDTA para preservação da integridade celular, enquanto o soro foi obtido em tubos livres de anticoagulantes (Figura 15 e 16).

**Figura 15** – Coleta de sangue da veia jugular de cordeiro, em centro de manejo, com contenção física na EMBRAPA.



Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

**Figura 16** – Coleta de sangue da veia jugular de ovino, no brete com auxílio de contenção física no CTO.



Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

## **5 Avaliação Clínica**

É importante ressaltar que essas informações não estavam originalmente incluídas no planejamento da pesquisa. A decisão de coletar esses dados adicionais foi tomada posteriormente, visando aprimorar a rastreabilidade e compreensão mais abrangente dos resultados obtidos.

### **5.1 Avaliação Individual**

Simultaneamente à coleta de amostras biológicas, cada animal foi submetido a uma avaliação clínica detalhada. Essa avaliação abrangente incluiu:

#### **5.1.1 Escore Corporal**

Foi realizada uma análise minuciosa do estado corporal de cada animal para avaliar sua condição física geral. Utilizando a escala de 1 a 5, atribuindo 1 para animal muito magro e 5 para muito gordo.

A avaliação do escore de condição corporal deve ser feita através da palpação, nunca apenas olhando o animal. Deve-se localizar as costelas e após o último par de costelas, palpar o processo transversal e o processo espinhoso das vértebras, graduando de acordo com a quantidade de músculos e gordura ali depositados, como mostra a figura 17.

**Figura 17 –** Escore de Condição Corporal.



Fonte: Capril virtual, (2009).

### 5.1.2 Obtenção do Peso Corporal

O peso corporal de cada animal foi obtido como parte integrante da avaliação clínica (Figura 18).

**Figura 18** – Pesagem de ovino



Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

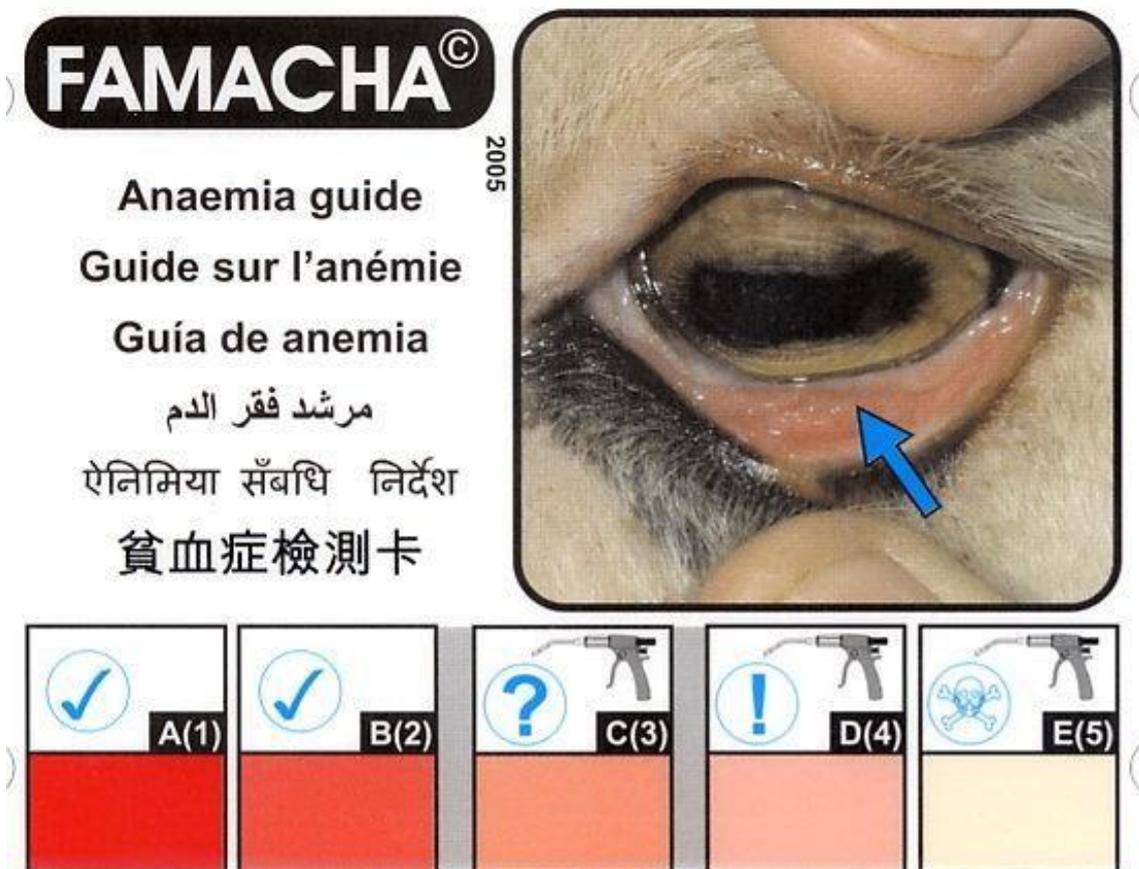
### 5.1.3 Determinação do Sexo

O sexo de cada animal foi determinado após uma observação visual cuidadosa, que incluiu a identificação de características sexuais externas distintas, tais como a presença ou ausência de órgãos genitais externos específicos de machos e fêmeas.

### 5.1.4 Método Famacha©

Foi aplicado o método Famacha© como uma ferramenta para avaliação visual da mucosa ocular, auxiliando na detecção de possíveis verminoses (Figura 19).

Figura 19 – Cartão de avaliação do Método Famacha® no controle integrado de verminose.



Fonte: Carvalho; Molento, (2015).

#### 5.1.4 Avaliação Geral por Pesquisa de Ectoparasitas

Uma avaliação geral foi conduzida para detectar qualquer alteração evidente na saúde dos animais, com foco na pesquisa de ectoparasitas.

#### 5.1.5 Observações Clínicas Relevantes

O Espaço foi destinado para registrar quaisquer observações clínicas relevantes identificadas durante a coleta. Todos esses dados foram cuidadosamente registrados no questionário individual de cada animal, proporcionando uma visão abrangente de seu estado de saúde e permitindo correlações posteriores com os resultados laboratoriais.

Essa avaliação clínica multifacetada contribuiu para a obtenção de

informações detalhadas sobre a saúde e condição física dos ovinos, fortalecendo a integridade dos dados coletados durante o estudo.

## **5.2 Questionário**

Cada animal foi adicionado ao questionário, que foi preenchido durante a coleta das amostras (Apêndice A). O questionário continha informações detalhadas sobre sexo, escore corporal, método Famacha®, peso e quaisquer observações clínicas relevantes (Figura 20).

**Figura 20** – Preenchimento de questionário.



Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

## **5.3 Banco de dados**

Após a coleta, cada amostra e questionário foram devidamente registrados e identificados. Os animais foram individualmente identificados conforme o código do brinco de identificação específico de cada um. Esse registro de identificação incluiu:

### 5.3.1 Data de Coleta

No dia 09/09/2021 ocorreu a coleta na EMBRAPA e no dia 17/09/2021 foi realizada a coleta no CTO. Não há especificação de horário, uma vez que as coletas foram realizadas ao longo de todo o dia em cada local.

### 5.3.2 Código do Brinco

Atribuição e registro do código único associado ao brinco de identificação de cada animal (Figura 21).

**Figura 21** – Verificação dos códigos dos brincos de ovinos para preenchimento do questionário.



Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

### 5.3.3 Local de Coleta

Os animais aguardavam a coleta no curral de manejo, passavam pela seringa e então a coleta ocorria no brete, com exceção dos filhotes, para os quais as coletas foram realizadas fora do brete, com auxílio de contenção física. Essas atividades ocorreram tanto no CTO quanto na EMBRAPA (Figura 22).

**Figura 22** – Ovinos do CTO posicionados no brete avaliação física, preenchimento de questionário e coleta de amostra.



Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

Essas medidas não apenas garantiram a identificação individual precisa de cada amostra, mas também estabeleceram uma trilha de auditoria detalhada, permitindo uma análise eficiente e confiável dos resultados obtidos durante o estudo.

#### ***5.4 Transporte e Armazenamento***

As amostras foram transportadas em condições adequadas, respeitando os padrões de temperatura e tempo para garantir a preservação da integridade das amostras. O transporte foi realizado seguindo as normativas de segurança, minimizando qualquer impacto nos resultados. As amostras foram transportadas no mesmo dia da coleta e armazenadas em freezer -20°C até a realização de análises posteriores.

## **6. Identificação de *Coxiella* e *Rickettsia***

As amostras coletadas foram submetidas a rigorosos procedimentos de identificação visando a presença de bactérias do gênero *Coxiella* e *Rickettsia*. Os seguintes métodos foram empregados:

- **IFI (Técnica de Imunofluorescência Indireta):** Foi empregada para identificar e confirmar a presença de antígenos específicos de *Coxiella* e *Rickettsia* nas amostras.

- **PCR (Reação em Cadeia da Polimerase):** Técnicas moleculares sensíveis e específicas foram utilizadas para a amplificação e identificação de material genético das bactérias presente na amostra biológica (sangue EDTA).

### **6.1 Metodologia Laboratorial**

A metodologia laboratorial desempenhou um papel crucial na realização deste estudo, visando à identificação precisa de bactérias do gênero *Coxiella* e *Rickettsia*. As principais etapas da metodologia laboratorial incluíram:

#### **6.1.1 Imunofluorescência Indireta (IFI)**

- **Preparação de Amostras para IFI:** As amostras foram preparadas para análise por IFI, incluindo a fixação em lâminas e a marcação com anticorpos fluorescentes específicos para *Coxiella* e *Rickettsia*.

- **Leitura e Interpretação:** A leitura das lâminas foi realizada por meio de microscopia de fluorescência, permitindo a identificação visual das bactérias com base na fluorescência emitida pelos anticorpos marcados.

#### **6.1.2 Procedimento para Avaliação de Anticorpos Anti-*C. burnetii* e Anti-*Rickettsia* em Soros Ovinos por Imunofluorescência Indireta (RIFI)**

Amostras de sangue dos ovinos foram centrifugadas (3.000rpm, 10 minutos) no local da coleta, os soros resultantes foram divididos em alíquotas, identificados, armazenados e transportadas para o laboratório, onde

permaneceu -20°C, até o momento do teste por imunofluorescência indireta (RIFI).

As lâminas para RIFI foram produzidas pelo Prof Dr Marcelo B. Labruna do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. O protocolo seguiu as diretrizes específicas de Pacheco *et al.*, (2013) para *C. burnetii* e Labruna *et al.*, (2007) para *Rickettsia*. Essa abordagem integrada possibilitou a avaliação simultânea da presença de anticorpos anti-*C. burnetii* e anti-*Rickettsia* em ovinos, fornecendo uma compreensão mais abrangente da exposição a esses agentes infecciosos.

A avaliação da presença de anticorpos IgG anti-*C. burnetii* e anticorpos anti-*Rickettsia* nos soros ovinos foi conduzida pelo Teste de Anticorpo Fluorescente Indireto (RIFI). O método empregou antígenos brutos obtidos da cepa At12 para a detecção de anticorpos anti-*C. burnetii*, conforme protocolo delineado por Pacheco *et al.* (2013). Para a detecção de anticorpos anti-*Rickettsia*, utilizou-se antígenos brutos derivados da cepa *R. rickettsii* Taiacu. Esse procedimento visa fornecer uma compreensão abrangente da resposta imunológica dos ovinos a esses agentes patogênicos, utilizando uma técnica reconhecida pela sua sensibilidade e especificidade.

As cepas foram cultivadas em células Vero e a colheita ocorreu quando aproximadamente 100% das células estavam infectadas. As células infectadas foram submetidas a uma centrifugação a 12.000 g por 10 minutos. O sedimento resultante foi lavado em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7.4), centrifugado novamente e ressuspenso em PBS contendo azida de sódio a 0.1%. As lâminas de antígeno foram preparadas, sendo que cada uma continha 10 µL de células infectadas. Essas lâminas foram armazenadas a -20 °C até o momento de sua utilização.

Os soros dos animais foram diluídos em PBS em incrementos de duas vezes, iniciando com uma diluição de 1:64. Para a incubação e marcação, 10 µL de soro diluído foram adicionados a cada poço das lâminas de antígeno, seguidos por incubação a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Após a incubação, as lâminas foram enxaguadas uma vez e lavadas duas vezes por 10 minutos em PBS. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com anti-cabra de coelho marcado com isotiocianato de fluoresceína (diluição 1:1.000 para

*Coxiella*, 1:600 para *Rickettsia*) e IgG de coelho anti-ovelha, sendo novamente lavadas conforme descrito anteriormente. Para a leitura e interpretação, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada e examinadas em um microscópio ultravioleta (Olympus, Tóquio, Japão) com ampliação de 400x.

As amostras foram executadas em duplicatas, sendo considerado que o soro continha anticorpos contra *C. burnetii* e *R. rickettsii* se apresentasse reatividade na diluição de 1:64. Controles positivos (soro sabidamente reativo) e negativos (soro não reativo) foram incluídos em cada lâmina, garantindo a validade dos resultados.

## 6.2 Preparação do DNA genômico

- Extração de Ácido Nucleico: A extração de ácido nucleico foi realizada a partir da amostra biológica (sangue EDTA) das ovelhas pantaneiras utilizando o kit Blood-Animal-Plant DNA Preparation, marca Cellco Biotec (Figura 23).

**Figura 23** – Representação da extração do DNA genômico



Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

As etapas específicas para apreparação do DNA a partir do sangue foram conduzidas da seguinte maneira:

### 6.2.1 Extração de DNA

Na etapa de preparação da amostra, foram misturados 200  $\mu\text{L}$  (1 volume) de sangue com 1 mL (5 volumes) de Blood Lysis Buffer. A mistura foi incubada por 10 minutos no gelo, realizando breves misturas vortex de aproximadamente 10 segundos de 2-3 vezes durante a incubação. Em seguida, procedeu-se com a centrifugação a 10.000 g por 10 minutos e 20 segundos para peletizar os glóbulos brancos, seguido pela remoção completa do sobrenadante. Para a etapa de lise celular, foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  de Lysis Buffer e 2  $\mu\text{L}$  de RNase A ao pellet celular. Foram realizados vigorosos vórtices por 30-60 segundos, adicionados 8  $\mu\text{L}$  de Proteinase K e misturados por pipetagem. A incubação ocorreu a 60 °C por 10 minutos, seguida por resfriamento por 5 minutos. Adicionalmente, foram acrescentados 300  $\mu\text{L}$  de Binding buffer, realizado um breve vórtice de 10 segundos, incubado no gelo por 5 minutos. Em seguida, realizou-se a centrifugação por 5 minutos e 20 segundos a 10.000 g. Na etapa de ativação da coluna, o sobrenadante foi pipetado diretamente na coluna de rotação. A centrifugação foi realizada por 1 minuto e 20 segundos a 10.000 g, seguida da descarta do líquido do tubo coletor. Para a primeira lavagem, adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de Washing Buffer na coluna de rotação e realizou-se a centrifugação por 50 segundos a 10.000 g, seguida do descarte do líquido do tubo coletor. Na etapa de segunda lavagem, adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de Washing Buffer na coluna de rotação. A centrifugação foi realizada por 50 segundos a 10.000 g. O líquido do tubo coletor foi descartado, e a coluna foi retornada. Em seguida, realizou-se nova centrifugação a 10.00 g por 1 minuto e 20 segundos para remover resíduos do tampão de lavagem. O tubo coletor de 2 mL foi descartado, e a coluna foi colocada no tubo final de 1,5 mL, devidamente identificado para a eluição do DNA. Na fase de eluição do DNA, adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de Elution Buffer no centro da coluna. Houve uma incubação à temperatura ambiente por 1 minuto, seguida de centrifugação a 10.000 g por 2 minutos e 20 segundos. O DNA eluído foi armazenado a -20 °C para análises futuras.

### 6.2.2 Dosagem de DNA pelo Kit de ensaio Qubit™ dsDNA BR

A quantificação do DNA foi conduzida por meio do método Qubit, um sistema de mensuração de ácidos nucleicos baseado em fluorometria. Esse método utiliza a afinidade específica entre corantes fluorescentes e ácidos nucleicos para determinar a concentração precisa de DNA em uma amostra. O procedimento teve início com a cuidadosa preparação das amostras de DNA, garantindo a integridade e pureza do material genético. Os reagentes do kit Qubit foram meticulosamente preparados de acordo com as instruções do fabricante. A solução de trabalho (Qubit buffer + Qubit reagente) foi preparada de acordo com a quantidade de amostras a serem dosadas. As amostras foram combinadas com o reagente Qubit, que inclui um corante fluorescente altamente seletivo para ácidos nucleicos. A interação específica entre o corante e as moléculas de DNA possibilitou a eficaz marcação das amostras. Em cada tubo, 198 µL de solução foram combinados com 2 µL de DNA, agitados vigorosamente em vórtice por 3 a 5 segundos, com precaução para evitar bolhas. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 2 minutos, seguido pela leitura dos padrões e amostras. Antes da análise, o equipamento Qubit foi devidamente calibrado utilizando padrões fornecidos pelo kit, estabelecendo uma relação linear entre a concentração de DNA e a intensidade de fluorescência. A leitura no equipamento Qubit permitiu a quantificação precisa da concentração de DNA, comparando a com os padrões previamente calibrados. Essa análise da concentração de DNA é fundamental para assegurar a confiabilidade das análises moleculares subsequentes, fornecendo uma base sólida para a interpretação dos dados genéticos obtidos. Essa etapa foi concluída com êxito durante a realização do estudo.

### **6.3 Técnicas Moleculares**

- PCR (Reação em Cadeia da Polimerase): Técnicas de PCR foram empregadas para amplificar regiões específicas do DNA das bactérias alvo, permitindo sua identificação genética (Figura 24).

Figura 24 - Representação da preparação do Mix para PCR



Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

### 6.3.1 PCR Convencional para o Gene Endógeno da Proteína de Ligação aos Retinóides Inter-Fotorreceptores (IRBP)

A reação de PCR foi conduzida conforme o protocolo estabelecido por Ferreira *et al.*, (2010). O mix de reação foi meticulosamente preparado para alcançar um volume final de 25  $\mu\text{L}$ , composto por 15,11  $\mu\text{L}$  de água livre de nucleases, 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão, 0,75  $\mu\text{L}$  de cloreto de magnésio (50mM), 0,5  $\mu\text{L}$  de uma mistura de desoxinucleotídeos (10mM), 0,6  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleotídeo iniciador (10mM), direcionado a um fragmento específico de 227 pb. Além disso, foram adicionados 0,14  $\mu\text{L}$  de Platinum Taq DNA polimerase (5U/ $\mu\text{L}$ Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 5 $\mu\text{L}$  de DNA da amostra.

Para a amplificação do gene IRBP, as seguintes condições foram aplicadas no termociclador: uma desnaturação inicial a 95 °C por 4 minutos, seguida por 35 ciclos compostos por desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 57 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. A etapa final consistiu em uma extensão a 72 °C por 5 minutos, conforme descrito no Quadro 1.

**Quadro 1** – Protocolos de PCR, oligonucleotídeos “primers” utilizados para detecção de gene IRBP.

Primers	Sequências (5' – 3')	Tamanho do fragmento	Condições do ciclo	Referência
IRBP	TCCAACACCACCACTGAGATCTGGAC	227 pb	95°C por 4 min. 35 ciclos de: 94°C por 30 seg., 57°C por 30 seg., 72°C por 1 min. 72°C por 5min 4° C infinito	Ferreira <i>et al.</i> (2010).
	GTGAGGAAGAAATCGGACTGGCC			

Fonte: (FERREIRA *et al.*, 2010).

Controles de qualidade foram incorporados no experimento, utilizando água livre de nucleases como controle negativo. Como controle positivo, foi empregado DNA da amostra 27 de fígado de morcego (*Cynomops planirostris*), previamente testado e confirmado como positivo na PCR IRBP. Este controle positivo proporcionou uma referência confiável para a validação dos resultados obtidos.

### 6.3.2 Procedimento de PCR Convencional para *C. burnetii*

As amostras de DNA foram submetidas à avaliação de sua concentração bruta para detecção de DNA de *C. burnetii*, empregando primers específicos para o gene em investigação.

A amplificação foi realizada por meio da preparação de uma mistura, totalizando um volume final de 25 µL. Essa mistura consistiu em 15,1 µL de água livre de nucleases, 2,5 µL de tampão, 0,75 µL de Cloreto de Magnésio (50mM), 0,25 µL de uma mistura de desoxinucleotídeos (20mM), 0,6 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (10mM), direcionado à amplificação de um fragmento de 687 pb, 0,2 µL de Platinum Taq DNA polimerase (5U/µL Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 5µL de amostra de DNA.

Todas as reações de PCR foram conduzidas com água livre de nucleases como controle negativo. Como controle positivo, utilizou-se uma amostra previamente confirmada como positiva para *C. burnetii*, proporcionando uma referência confiável para a validação dos resultados obtidos. As condições térmicas empregadas estão detalhadamente descritas no Quadro 2.

**Quadro 2** – Protocolos de PCR, oligonucleotídeos “primers” utilizados para detecção de *C. burnetii* na primeira reação de PCR.

Primers	Sequências (5' – 3')	Tamanho do fragmento	Condições do ciclo	Referência
<b>TRANS-1 (F)</b> e <b>TRANS-2 (R)</b> <b>citrato sintase</b>	TAT GTA TCC ACC GTA GCC AGT C	687 pb	95°C por 5 min. 40 ciclos de: 95°C por 30 seg., 60°C por 30 seg., 72°C por 1 min. e 72°C por 5min.	Hoover e colaboradores (1992) e Willems e colaboradores (1994).
	CCC AAC AAC ACC TCC TTA TTC			

Fonte: (HOOVER; VODKIN; WILLIAMS, 1992; WILLEMS *et al.*, 1994).

### 6.3.3 Procedimento de PCR Nested para *C. burnetii*

As amostras de DNA foram submetidas a testes de concentração bruta para detectar a presença de DNA de *C. burnetii*, utilizando primers específicos para o gene em investigação.

A reação de amplificação foi conduzida preparando um mix com um volume total final de 25 µL, composto por 18,1 µL de água livre de nucleases, 2,5 µL de tampão, 0,75 µL de Cloreto de Magnésio (50mM), 0,25 µL de uma mistura de desoxinucleotídeos (20mM), 0,6 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (10mM) destinado a amplificar um fragmento de 440 pb, 0,2 µL de Platinum Taq DNA polimerase (5U/µL Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 2 µL do DNA amostra proveniente da PCR anterior.

Todas as PCRs foram realizadas com água livre de nucleases como

controle negativo, enquanto um controle positivo consistindo em uma amostra previamente confirmada como positiva para *C. burnetii* foi incluído. As condições térmicas utilizadas e o tamanho do amplicon para o gene alvo estão detalhadamente descritos no Quadro 3.

**Quadro 3** – Protocolos de PCR, oligonucleotídeos “primers” utilizados para detecção de *C. burnetii* na segunda reação de PCR.

Primers	Sequências (5' – 3')	Tamanho do fragmento	Condições do ciclo	Referência
QBT +3 e QBT +4	AAGCGTGTGGAGGAGCGAACC	440 pb	95°C por 5 min. 30 ciclos de: 95°C por 30 seg., 66°C por 30 seg., 72°C por 30 seg. e 72°C por 5min.	Mares-guia (2016).
	CTCGTAATCACCAATCGCTTCGTC			

Fonte: (MARES-GUIA *et al.*, 2016).

#### 6.3.4 Procedimento de PCR convencional para *Rickettsia* spp.

As amostras de DNA foram submetidas a testes de concentração bruta para detectar a presença de DNA de *Rickettsia* spp., utilizando primers específicos para o gene em investigação.

A reação de amplificação foi conduzida preparando um mix com um volume total final de 25 µL, composto por 16,3 µL de água livre de nucleases, 2,5 µL de tampão, 0,75 µL de Cloreto de Magnésio (50mM), 0,25 µL de uma mistura de desoxinucleotídeos (20mM), 0,5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (10mM) destinado a amplificar um fragmento de 401 pb, 0,2 µL de Platinum Taq DNA polimerase (5U/µL Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 4 µL do DNA.

Todas as PCRs foram realizadas com água livre de nucleases como controle negativo, enquanto um controle positivo consistindo em uma cultura de *Rickettsia* spp. foi incluído. As condições térmicas utilizadas e o tamanho do

amplicon para o gene alvo estão detalhadamente descritos no Quadro 4.

**Quadro 4** – Protocolos de PCR, oligonucleotídeos “primers” utilizados para detecção de *Rickettsia* spp. na primeira reação de PCR.

Primers	Sequências (5' – 3')	Tamanho do fragmento	Condições do ciclo	Referência
CS 78 (F) e CS 323 (R)	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAA T GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCA GGAT	401 pb	95°C por 3 min. 40 ciclos de: 95°C por 15 seg., 55°C por 30 seg., 72°C por 30 seg. 72°C por 7 min. 4° C infinito	Labruna <i>et al.</i> (2004),

Fonte: (LABRUNA *et al.*, 2004).

### 6.3.5 Procedimento de PCR convencional para *Rickettsia* spp.

As amostras de DNA foram submetidas a testes de concentração bruta para detectar a presença de DNA de *Rickettsia* spp., utilizando primers específicos para o gene em investigação.

A reação de amplificação foi conduzida preparando um mix com um volume total final de 25 µL, composto por 16,3 µL de água livre de nucleases, 2,5 µL de tampão, 0,75 µL de Cloreto de Magnésio (50mM), 0,25 µL de uma mistura de desoxinucleotídeos (20mM), 0,5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (10mM) destinado a amplificar um fragmento de 631 pb, 0,2 µL de Platinum Taq DNA polimerase (5U/µL Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 4 µL do DNA.

Todas as PCRs foram realizadas com água livre de nucleases como controle negativo, enquanto um controle positivo consistindo em uma cultura de *Rickettsia* spp. foi incluído. As condições térmicas utilizadas e o tamanho do amplicon para o gene alvo estão detalhadamente descritos no Quadro 5.

**Quadro 5** – Protocolos de PCR, oligonucleotídeos “primers” utilizados para detecção de *Rickettsia* spp. na segunda reação de PCR.

Primers	Sequências (5' – 3')	Tamanho do fragmento	Condições do ciclo	Referência
ompA 190-70 (F) e ompA 190-701 (R)	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA  GTTCCGTTAATGGCAGCATCT	631 pb	95°C por 5 min. 35 ciclos de: 95°C por 20 seg., 58°C por 30 seg., 65°C por 45seg. 72°C por 10 min. 4° C infinito	Labruna <i>et al.</i> (2004).

Fonte: (LABRUNA *et al.*, 2004).

### 6.3.6 Procedimento de PCR Semi-nested para *Rickettsia* spp.

As amostras de DNA foram submetidas à análise em sua concentração bruta para detectar a presença de DNA de *Rickettsia* spp., utilizando primers específicos para o gene alvo.

A reação de amplificação foi realizada preparando um mix com volume total final de 25 µL. Este mix consistiu em 16,3 µL de água livre de nucleases, 2,5 µL de tampão, 0,75 µL de Cloreto de Magnésio (50mM), 0,25 µL de uma mistura de desoxinucleotídeos (20mM), 0,5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (10mM) destinado a amplificar um fragmento de 532 pb, 0,2 µL de Platinum Taq DNA polimerase (5U/µL Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 1 µL do DNA da amostra proveniente da PCR anterior.

Todas as PCRs foram conduzidas com água livre de nucleases como controle negativo, enquanto um controle positivo, composto por uma amostra sabidamente positiva para *Rickettsia* spp., foi incluído para validar os resultados. As condições térmicas utilizadas e o tamanho do amplicon para o gene alvo estão detalhadamente descritos no Quadro 6.

**Quadro 6** – Protocolos de PCR, oligonucleotídeos “primers” utilizados para detecção de *Rickettsia* spp. na terceira reação de PCR.

Primers	Sequências (5' – 3')	Tamanho do fragmento	Condições do ciclo	Referência
ompA 190-70 (F) e ompA 190-602 (R)	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	532 pb	95°C por 5 min. 35 ciclos de: 95°C por 20 seg., 58°C por 30 seg., 65°C por 45seg. 72°C por 10 min. 4° C infinito	Labruna <i>et al.</i> (2004).
	AGTGCAGCATTTCGCTCCCC T			

Fonte: (LABRUNA *et al.*, 2004).

#### **6.4 Eletroforese em gel de agarose**

Os produtos amplificados por PCR convencional foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com SYBR® Safe DNA Gel (Invitrogen), em tampão de corrida TBE 1x. O processo foi conduzido sob as condições de 50V durante 10 minutos e 100V durante 60 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados, utilizou-se um marcador de peso molecular de 100 pb DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Os resultados foram visualizados e analisados em um fotodocumentador para captura de geis de eletroforese – L-PIX TOUCH (Loccus).

#### **6.5 Controle de Qualidade**

O controle de reações e resultados foram realizados a partir de procedimentos de controle de qualidade foram rigorosamente aplicados em todas as etapas, incluindo reações de controle negativo e positivo, assegurando a validade e confiabilidade dos resultados laboratoriais. A metodologia laboratorial adotada foi cuidadosamente planejada e executada para garantir a consistência e a confiabilidade dos dados obtidos durante o estudo.

## **7 RESULTADOS**

### **7.1 Obtenção das amostras**

Foram coletadas um total de 287 amostras de ovinos em dois municípios do estado do Mato Grosso do Sul: Campo Grande (129 amostras do CTO) e Terenos (158 amostras da EMBRAPA).

### **7.2 Identificação morfológica**

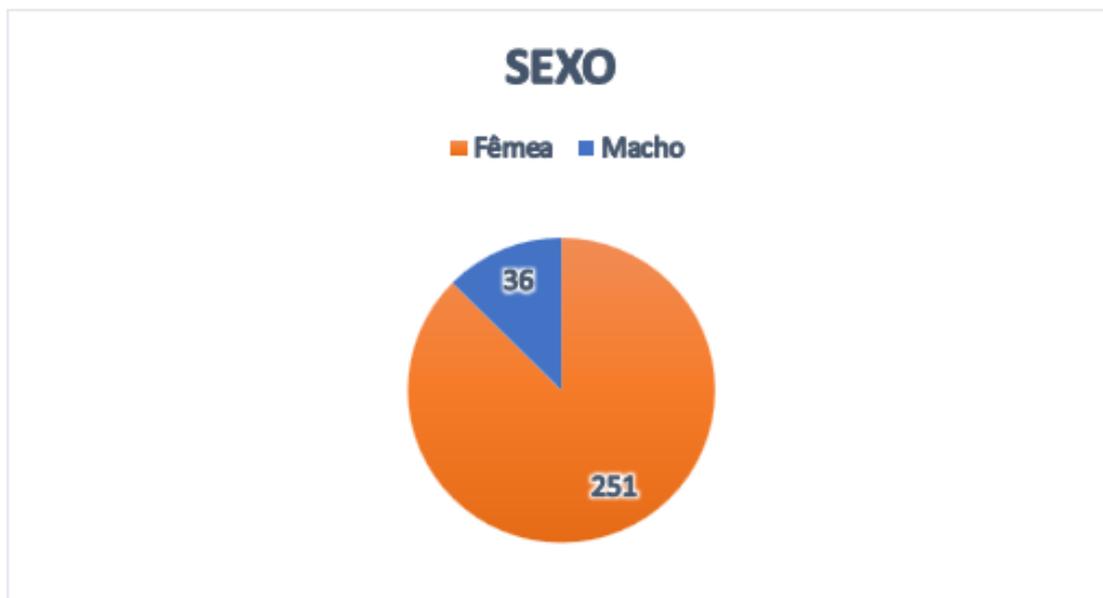
Os ovinos, classificados como mamíferos ruminantes bóvidos, pertencem ao gênero *Ovis*, à família *Bovidae* e à subfamília *Caprinae*, especificamente à espécie *Ovis aries*. A identificação morfológica dos espécimes foi realizada com base em características anatômicas distintivas, semelhanças de pelagem e características físicas específicas dessa espécie.

### **7.3 Avaliação clínica**

#### **7.3.1 Sexo dos Ovinos**

Analisando os 287 ovinos, observamos que 36 são machos (12,54%) e 251 são fêmeas (87,46%), conforme ilustrado no Gráfico 1.

**Gráfico 1** – Distribuição de sexo nos Ovinos Analisados.



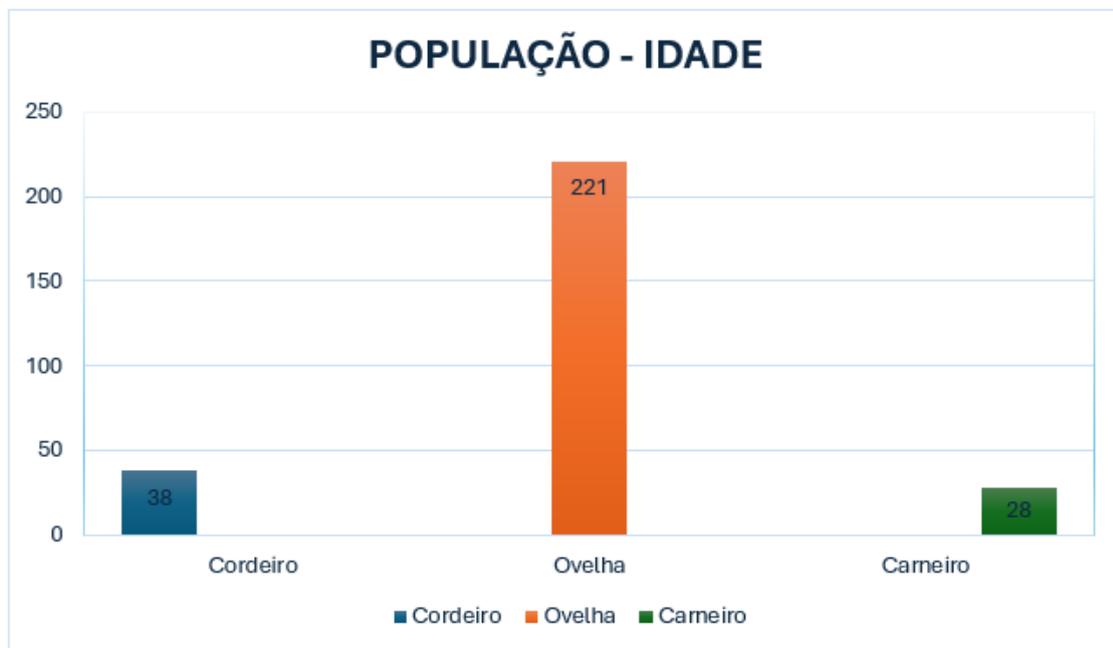
Legenda: Azul Machos: 36 (12,54%) e Laranja - Fêmeas: 251 (87,46%). Fonte: Autoria própria, (2024).

Essa distribuição destaca uma predominância significativa de fêmeas na amostra, representando a maioria da população estudada. A relevância do sexo na epidemiologia dessas doenças pode estar relacionada a diversos fatores, como diferenças comportamentais, resposta imunológica, práticas de manejo distintas e variações hormonais entre machos e fêmeas.

### 7.3.2 Distribuição Populacional por Categoria

A composição da nossa população ovina é diversificada, incluindo: 38 cordeiros (13,24%), 221 ovelhas (77,00%) e 28 carneiros (9,75%) conforme representado no Gráfico 2.

**Gráfico 2** – A representação visual ilustra a distribuição demográfica da nossa população ovina.



Fonte: Autoria própria, (2024).

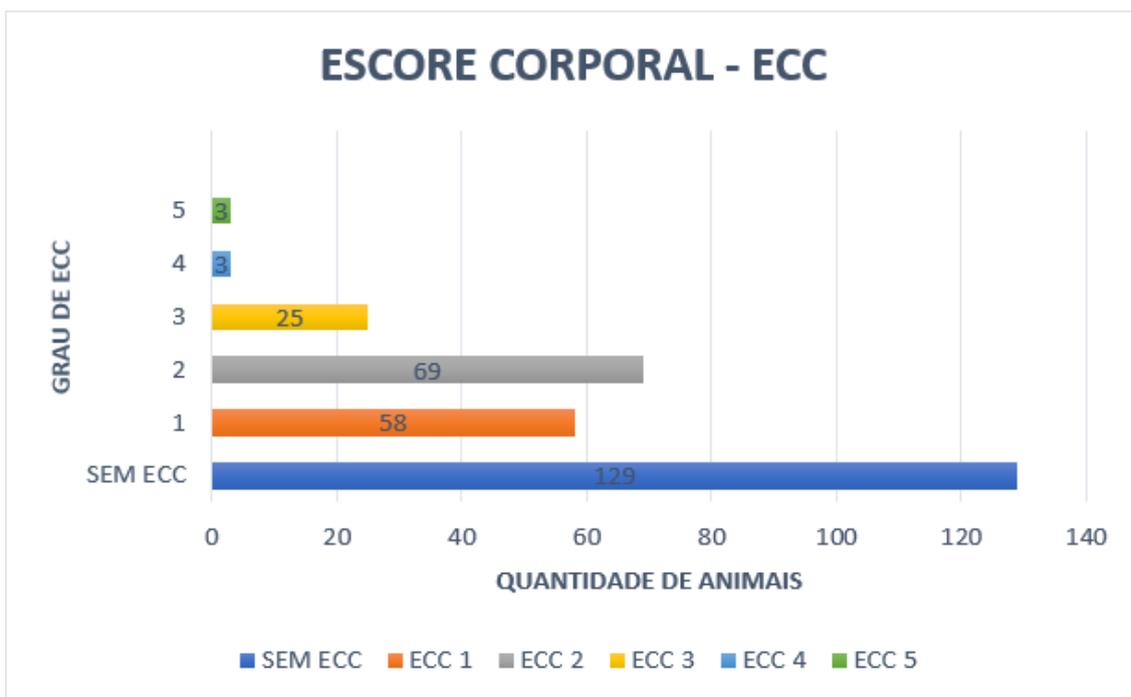
Essa divisão entre cordeiros, ovelhas e carneiros é essencial para compreender a dinâmica demográfica do rebanho. Os cordeiros representam a nova geração, enquanto as ovelhas formam a maioria da população, desempenhando um papel vital na reprodução e na sustentabilidade do rebanho. Por fim, os carneiros, embora em menor número, contribuem para a diversidade genética e influenciam as dinâmicas reprodutivas.

### 7.3.3 Avaliação do Escore Corporal (ECC) dos Ovinos

Dos 287 ovinos analisados: **129 ovinos (44,98%)** não tiveram ECC avaliada devido a serem filhotes e/ou outros motivos, **58 ovinos (20,21%)** foram classificados com ECC 1, indicando uma condição corporal extremamente magra, **69 ovinos (24,04%)** receberam a classificação de ECC 2, demonstrando uma condição corporal magra, mas com algumas evidências de gordura, **25 ovinos (8,71%)** foram avaliados como ECC 3, indicando uma condição corporal moderada, com uma quantidade adequada de gordura, **3 ovinos (1,05%)** foram classificados como ECC 4, revelando uma condição

corporal gorda, com uma quantidade substancial de gordura, **3 ovinos (1,05%)** foram avaliados como ECC 5, indicando uma condição corporal excessivamente gorda, com uma quantidade exagerada de gordura (Gráfico 3).

**Gráfico 3** – Representação visual da avaliação do Escore Corporal (ECC) dos ovinos, evidenciando adversidade nas condições corporais.



Fonte: Autoria própria, (2024).

Essa avaliação do ECC fornece uma visão detalhada da condição corporal da população ovina. A consideração desses dados é crucial para a implementação de estratégias de manejo e nutrição, visando manter a saúde e o bem-estar do rebanho.

#### 7.3.4 Peso Corporal

O estudo revelou que, dos 287 animais avaliados, a média de peso foi de 33,16 kg. Esta média é representativa da massa corporal observada na amostra, oferecendo uma perspectiva central do perfil ponderal dos ovinos analisados. A distribuição de peso na amostra varia entre 4,1 kg, o menor peso

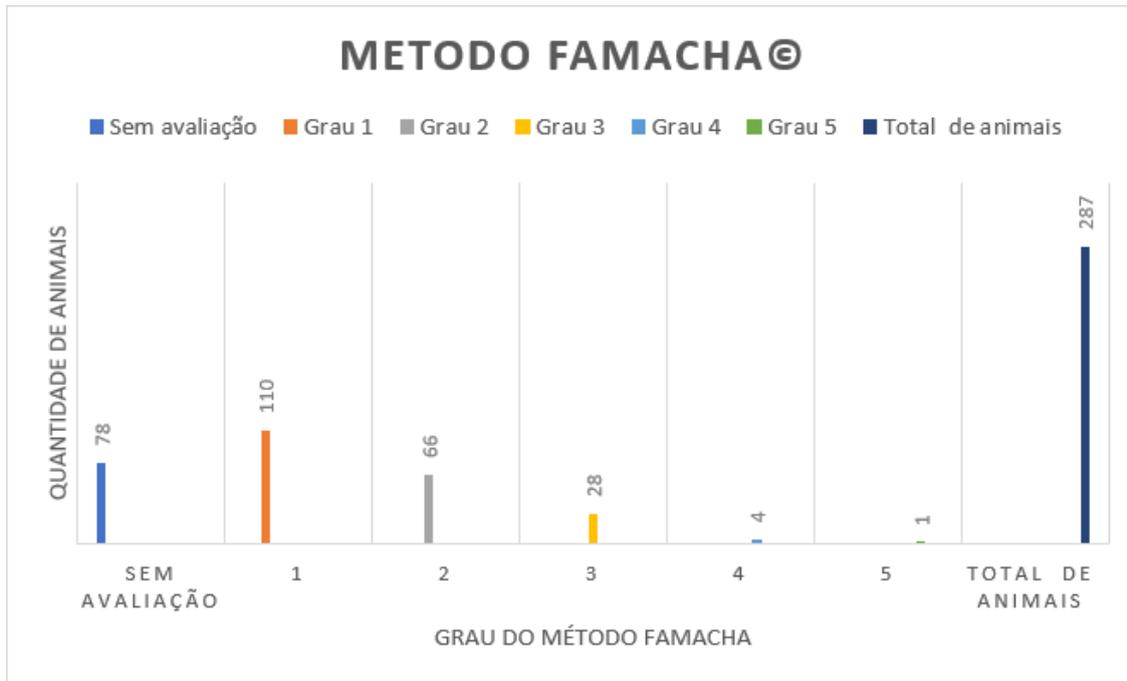
registrado, e 97,5 kg, o maior peso registrado.

Essa amplitude considerável destaca a diversidade no tamanho corporal dos ovinos estudados. A variação de peso é crucial para uma compreensão mais abrangente do estado físico do rebanho. Além da média, os extremos de peso fornecem entendimentos valiosos sobre a variabilidade e a heterogeneidade da população ovina, o que pode ter implicações significativas em termos de manejo, nutrição e saúde geral do rebanho.

#### 7.3.5 Método Famacha©

O Método Famacha© foi empregado para avaliar condição parasitária (verminoses) e diferentes graus de anemias em 287 animais. Os resultados indicaram uma distribuição variada nas categorias Famacha©, com escore 1 sendo a mais comum, representando 38,32% do total (110 animais). Por outro lado, o escore 5 foi observada em apenas 0,35% dos animais (1 animal). Notavelmente, 78 animais (27,17%) não tiveram a condição de Famacha© registrada na planilha (Gráfico 4).

**Gráfico 4** – Representação visual da distribuição das categorias Famacha© nos 287 animais analisados.



Legenda: Famacha© 1 (38,32%): Menor infestação parasitária; Famacha© 2, 3, 4: Distribuição variada nas categorias; Famacha© 5 (0,35%): Casos mais graves de infestação; Sem Registro (27,17%): Condição Famacha© não registrada. Fonte: Autoria própria, (2024).

Esses resultados destacam a diversidade na suscetibilidade parasitária dentro da população estudada. A alta prevalência de animais com Famacha© score 1 pode indicar casos mais brandos de parasitismo, enquanto a presença de um número limitado de animais com Famacha© score 5 sugere casos mais graves de infestação.

### 7.3.6 Avaliação Geral por Pesquisa de Ectoparasitas

Durante o processo de coleta de amostras e dados para esta pesquisa, observou-se uma ausência de ectoparasitas nos ovinos analisados. Não foram identificados sinais ou evidências de infestação por ectoparasitas ao longo do período de estudo. Essa constatação é crucial para compreender a condição sanitária do rebanho, pois a ausência de ectoparasitas contribui positivamente para a saúde e bem-estar dos ovinos, reduzindo o risco de

transmissão de patógenos associados a esses parasitas.

### 8.3.7 Observações Clínicas Relevantes

Das 287 ovelhas analisadas, 30 (10,45%) apresentaram observações clínicas dignas de nota. Essas observações incluíram:

- **1 Ovino com Abscesso Dentário:** Representando aproximadamente 0,34% da população.

- **25 Ovinos com Secreção Nasal:** Equivalente a cerca de 8,71% do total.

- **4 Ovinos com Linfadenite:** Correspondendo a aproximadamente 1,4% da população.

Essas observações clínicas destacam a importância de monitorar de perto a saúde do rebanho. A identificação precoce de alterações clínicas permite a implementação de medidas corretivas e preventivas, contribuindo para a saúde global e o bem-estar dos ovinos ao longo do estudo.

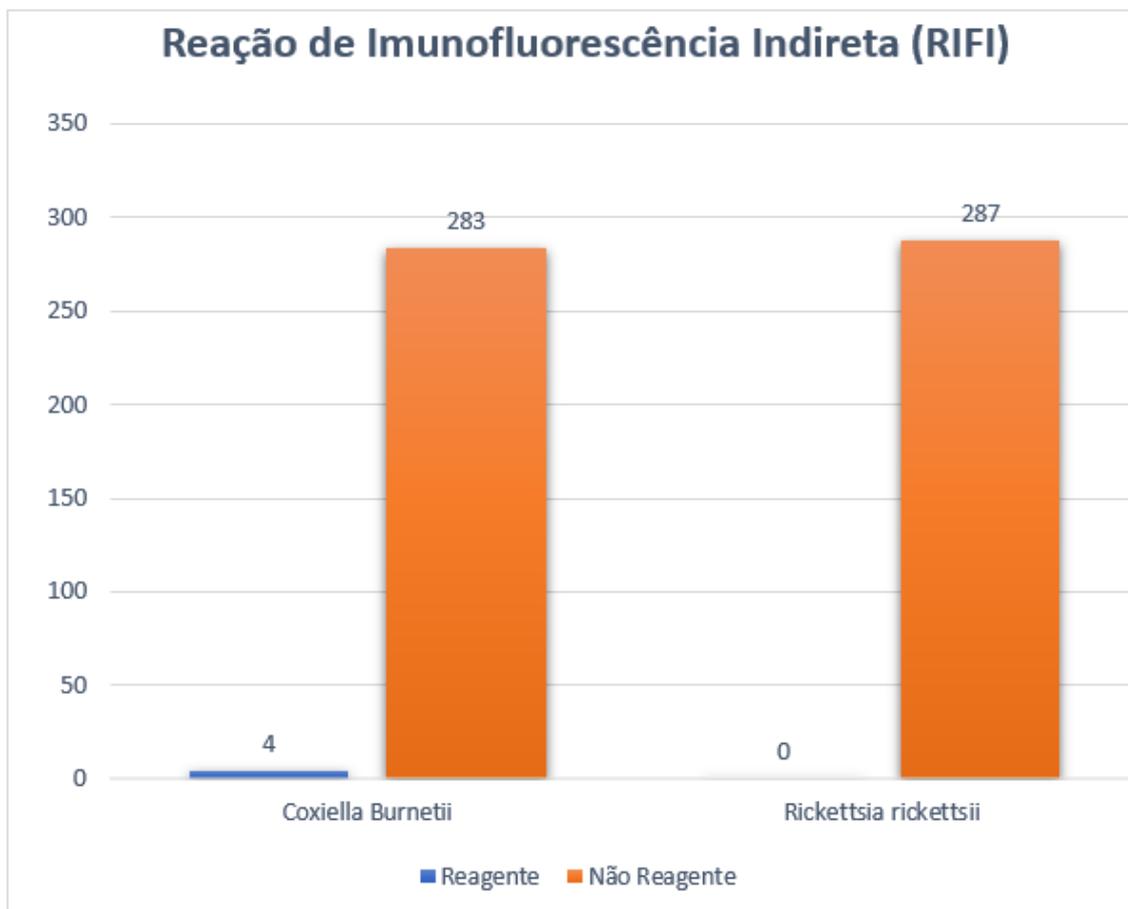
### **7.4 Dosagem de DNA pelo Método Qubit**

Para avaliar a concentração de DNA extraído das amostras de sangue EDTA de ovinos, utilizamos o método Qubit, que emprega fluorometria para quantificar com precisão a quantidade de DNA presente. Das 287 amostras analisadas, a concentração média de DNA foi de 61,5 ng/ $\mu$ L. Essa avaliação da concentração de DNA é crucial para garantir a qualidade das amostras e a eficácia das análises moleculares realizadas. A variação na concentração de DNA entre as amostras pode fornecer informações valiosas sobre a integridade do material genético coletado. Esses resultados são fundamentais para assegurar a confiabilidade das análises moleculares subsequentes, proporcionando uma base sólida para a interpretação dos dados genéticos obtidos.

### 7.5 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *C. burnetii* e *R. rickettsii*

Ao analisar as 287 amostras por Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), identificamos que aproximadamente 4 amostras, apresentaram reatividade na diluição 1:64 para *C. burnetii*, o que representa 1,4% do total analisado. Ressaltando que nenhuma das amostras demonstrou reatividade para *R. Rickettsii* (Gráfico 5).

**Gráfico 5** – Distribuição de amostras reativas à *C. burnetii* na diluição 1:64.



Fonte: Autoria própria, (2024).

Dessas amostras reativas, 3 eram provenientes da EMBRAPA, no município de Terenos, e 1 era do CTO, no município de Campo Grande (Tabela 1).

**Tabela 1** – Perfil de reatividade na RIFI para *C. burnetii* (diluição 1:64).

Nº da amostra	Data da coleta	Local de coleta	Id. animal	Sexo	Famacha	Peso	ECC	Sorologia
55	09/09/2021	EMBRAPA - MS	1000	Fêmea	1	44,4 kg	3	R = 1:64
65	09/09/2021	EMBRAPA - MS	1952	Fêmea	1	39,5 kg	2	R = 1:64
67	09/09/2021	EMBRAPA - MS	1955	Fêmea	1	27,8 kg	2	R = 1:64
195	17/09/2021	CTO	2548	Fêmea	3	32,7 kg	2	R = 1:64

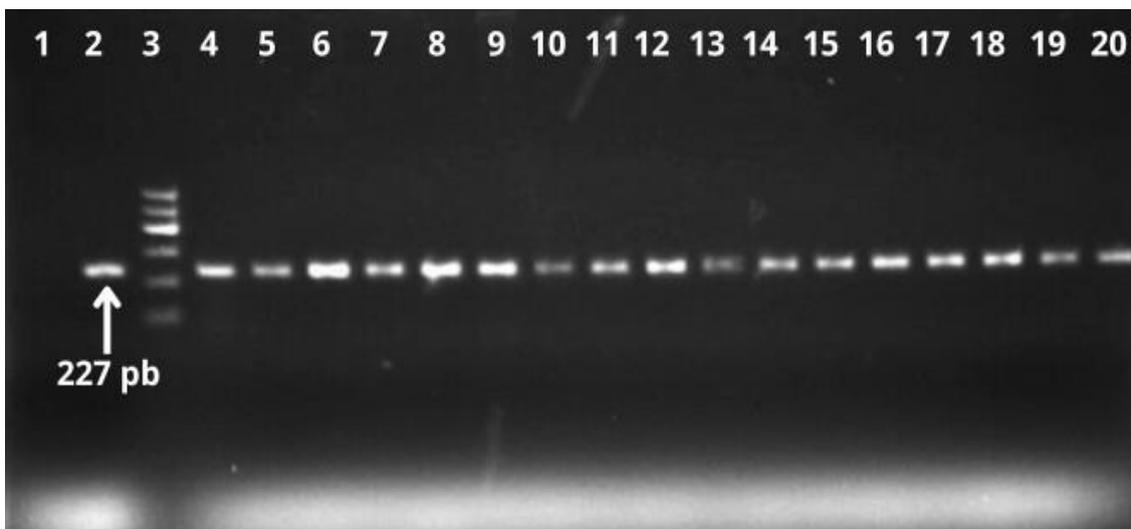
Legenda: R – Reativo. Fonte: Autoria própria, (2024).

Após uma análise minuciosa das amostras reativas (4), identificou-se que tanto na propriedade da Embrapa quanto no CTO, há a presença de outros animais além dos ovinos, como bovinos, equinos e animais de vida livre, nas proximidades dos rebanhos. Durante o período de coleta, não foram relatados casos de abortos recentes em nenhum dos locais. No entanto, observou-se a prática de venda de animais para outras localidades, como o Paraguai. Essas informações destacam a diversidade de animais nas propriedades e as atividades comerciais envolvendo a venda de animais.

### **7.6 PCR convencional para o IRBP**

Para garantir a qualidade da extração de DNA nas amostras de ovinos, realizamos testes de PCR direcionados ao gene IRBP (Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein) como um controle endógeno. A concentração bruta de DNA escolhida para a PCR foi criteriosamente selecionada e confirmada após o processo de extração. É relevante destacar que todas as 287 amostras analisadas exibiram positividade para o gene IRBP, atingindo uma taxa de 100% de detecção (Figura 25).

**Figura 25** – Eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe, para protocolo PCR dirigido ao gene IRBP 227 pb. Produto amplificado de PCR a partir de DNA de sangue de ovino.



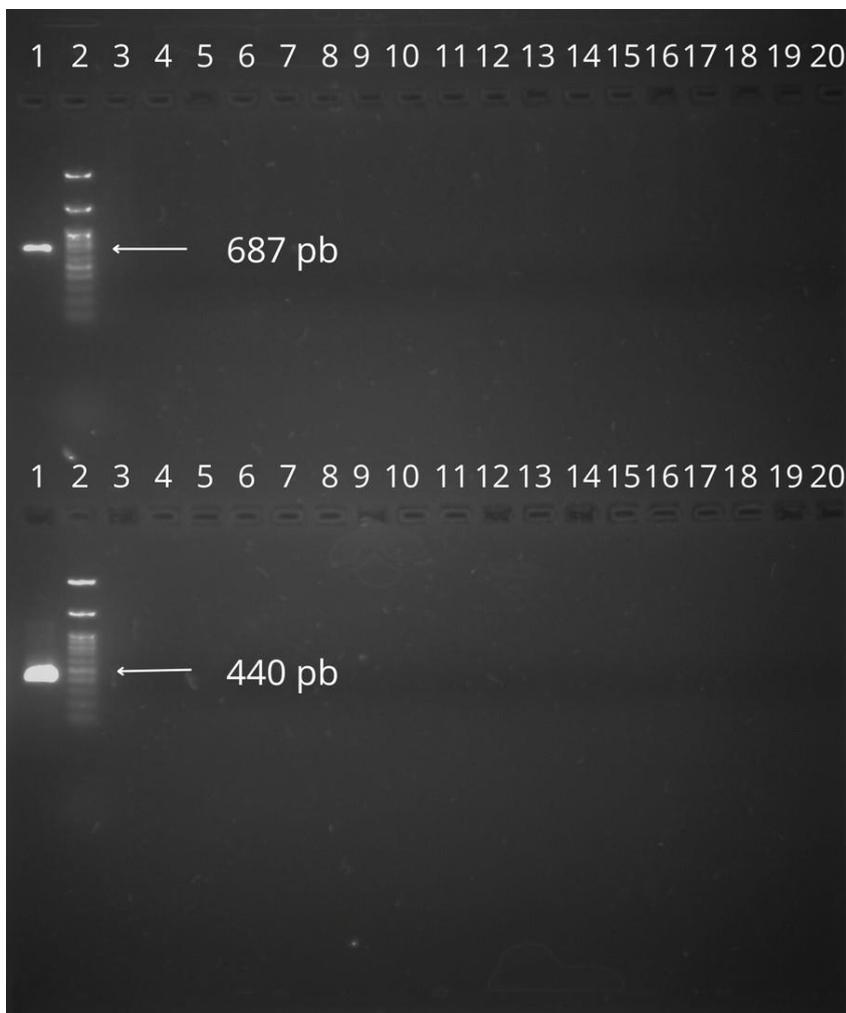
Legenda: 1 - Controle negativo (C-), 2 - Controle positivo (C+), 3 - Peso molecular 100pb (PM), 4 - 20 amostras analisadas. Fonte: Autoria própria, (2024).

Esse resultado robusto sugere a eficácia da extração de DNA e a preservação da integridade genética nas amostras coletadas.

### **7.7 PCR e nested para *C. burnetii***

No ensaio de PCR destinado aos genes TRANS e QBT (Figura 26), foram analisadas as 287 amostras coletadas. O DNA de *C. burnetii* não foi amplificado em nenhuma das amostras de ovinos examinadas. Esses resultados sugerem a ausência de infecção por *C. burnetii* nas amostras de ovinos obtidas nos dois municípios estudados (Campo Grande e Terenos).

**Figura 26** – Eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe, para protocolo PCR dirigida ao gene TRANS 687 pb e QBT 440 pb para *C. burnetti*. Produto amplificado de PCR a partir de DNA de sangue de ovino.



Legenda: 1 - Controle negativo (C+), 2 - Peso molecular 100pb (PM), 3 a 19 - amostras testadas, 20 - Controle positivo (C+). Fonte: Autoria própria, (2024).

### **7.8 PCR e Semi-nested para *Rickettsia* spp.**

No ensaio de PCR direcionado aos genes CS e ompA (Figura 27), todas as 287 amostras foram minuciosamente analisadas. Foi observado que o DNA de *Rickettsia* spp. não foi amplificado em nenhuma das amostras de ovino examinadas.

Esses resultados indicam a ausência de infecção por *Rickettsia* spp. nas populações de ovinos estudadas nos municípios de Campo Grande e Terenos.

**Figura 27** – Eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe, para protocolo PCR dirigida ao gene CS 401 pb para *Rickettsia* spp. Produto amplificado de PCR a partir de DNA de sangue de ovino.



Legenda: 1 - Controle positivo (C+), 2 - Peso molecular 100pb (PM), 3 a 19 - amostras analisadas, 20 - Controle negativo (C-). Fonte: Autoria própria, (2024).

Essas informações são cruciais para a compreensão da prevalência e distribuição de *C. burnetii* e *Rickettsia* spp., fornecendo uma base importante para investigações futuras sobre a epidemiologia e a gestão de doenças associadas a esses agentes patogênicos em populações ovinas.

## **7. 9 Atividades realizadas em respostas aos resultados obtidos**

### 7.9.1 Material de apoio a Vigilância Epidemiológica

Material didático em forma de *cards virtuais* foi elaborado para auxiliar na divulgação e educação em saúde. O material com informações sucintas mais importantes não somente da doença mais também sobre seu ciclo e como se proteger foram disponibilizados assim como os contatos para orientações futuras, caso necessário (Apêndice B).

Além disso foram ministradas palestras e dadas orientações presenciais para sensibilização de profissionais de saúde e durante as atividades de campo, visando à obtenção de um conhecimento melhor sobre a doença, a forma de manutenção do agente no ambiente e as medidas de prevenção.

## 8 DISCUSSÃO

Esta pesquisa representa um avanço pioneiro no estudo das bactérias *C. burnetii* e *Rickettsia* sp. em ovinos pantaneiros no estado de Mato Grosso do Sul (MS). O conhecimento obtido é de grande importância não somente para saúde humana mas também para saúde animal, considerando a magnitude dessas zoonoses cuja similaridade clínica com outras doenças como dengue e influenza, associada com a falta de conhecimento por parte dos profissionais de saúde, permitem não realizar o diagnóstico adequado e classificar a febre Q como doença negligenciada no território brasileiro.

É amplamente reconhecido o papel das ovelhas na transmissão de zoonoses, dada sua estreita convivência com seres humanos e sua posição na cadeia alimentar. No Brasil, a criação de ovinos desempenha um papel econômico importante, especialmente em regiões como o Pantanal, onde é uma prática tradicional e essencial para a sustentabilidade socioeconômica das comunidades locais (SILVA *et al.*, 2021). A proximidade entre humanos e ovelhas aumenta substancialmente o risco de transmissão de doenças zoonóticas, tornando este estudo de suma importância para a saúde única. Além disso, os resultados desta pesquisa podem servir como base para estudos futuros, especialmente em áreas afetadas pela febre Q e febre maculosa brasileira, contribuindo para aspectos epidemiológicos e fornecendo uma base sólida para medidas preventivas e estratégias de controle mais eficazes.

### 8.1 Ovinos Pantaneiros e *C. burnetii*

A análise sorológica, realizada pelo método de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), revelou uma taxa de reatividade de 1,4% (4/287) indicando a primeira evidência do *C. burnetii* em ovinos pantaneiros no estado de Mato Grosso do Sul. Isso demonstra que 4 ovinos já foram expostos ao patógeno causador da coxielose.

Esses resultados estão em consonância com estudos prévios que também observaram uma baixa prevalência dessa bactéria em rebanhos ovinos.

Segundo Magouras *et al.* (2017) demonstraram uma soroprevalência de

1,8% (n:100) em ovinos na Suíça. No Brasil, Guimarães *et al.*, (2017) avaliou sorologicamente 153 ovinos no estado do Piauí, por RIFI, encontrando reatividade de 2% (3/153). De forma semelhante, em um estudo conduzido por Souza *et al.*, (2018) em uma região semiárida do nordeste brasileiro, foi constatada uma prevalência de 2,1% (9/403) de *C. burnetii* em ovinos.

No entanto, Mares-Guia *et al.*, (2014), encontraram uma reatividade significativamente mais alta, de 66,66% (2/3) pela RIFI em ovelhas no Rio de Janeiro, Brasil. Assim como Abbass *et al.*, (2020), relataram de 56%, em ovinos no Egito, pareando também com o estudo de Dajaba *et al.*, (2019), onde houve soropositividade em 46,88% (n:384) dos ovinos testados em fazendas do Líbano. No Paraguai foi relatada a primeira evidência da circulação do patógeno no país apresentando 45% (135/300) de anticorpos anti- *C. burnetii* em ovinos (FRANÇA *et al.*, 2024). Os resultados encontrados no Paraguai suscitam uma preocupação significativa, especialmente devido à proximidade geográfica com o estado de Mato Grosso do Sul e ao intenso comércio de ovinos e produtos lácteos dessa espécie entre os dois países.

Diante desse contexto, torna-se fundamental obter informações adicionais para rastrear a origem da infecção. Essa abordagem não apenas possibilitará a implementação de medidas preventivas na esfera da saúde pública, mas também contribuirá para preservar a saúde dos animais.

Essa disparidade na prevalência pode sugerir uma variação geográfica na distribuição desse agente patogênico, influenciada por fatores ambientais, climáticos e práticas de manejo específicas da região. No entanto é importante ressaltar, que a sensibilidade nas técnicas sorológicas como RIFI pode variar de acordo com diversos fatores, incluindo a fase da infecção, a qualidade da amostra e até mesmo a cepa do microrganismo (DORKO *et al.*, 2020).

Os resultados sorológicos encontrados podem indicar a hipótese de que a *C. burnetii* seja mantida no ambiente por animais silvestres. Apesar de poucos estudos sobre a prevalência da bactéria em animais silvestres, roedores silvestres de pequeno porte, são considerados reservatório desse microrganismo podendo estar envolvidos na transmissão do patógeno aos animais (ANGELAKIS; RAOULT, 2010; RAOULT; MARRIE, 1995).

Neste estudo, nenhum DNA de *C. burnetii* foi amplificado das 287 amostras de sangue total na técnica de Reação em cadeia da Polimerase

(PCR). Assim, pode-se concluir que, no momento da coleta do sangue, apesar de alguns ovinos apresentarem os sintomas inespecíficos, sugestivo de doenças infecciosas, como *coxiella* e Febre maculosa, eles não estavam infectados por nenhum dos patógenos causadores dessas doenças.

Gangoliya *et al.*, (2019), realizaram a primeira evidência molecular de infecção por *C. burnetti* na Índia, no qual identificou 7,3% (9/123) de positividade em esfregaços vaginais. Cumbassá *et al.*, (2015) encontraram em amostras de tecidos 10,53% (8/76) positividade em ovinos em Portugal. Resultado esse compatível estudo de Masala *et al.*, (2004), que detectou 10% em 40 fetos ovinos na Itália. No sul do Irã, Borhani *et al.*, (2023), avaliaram abomaso de fetos abortados e descobriu-se 23,9% (11/46) de positividade nas amostras de ovinos.

De acordo com Rodolakis *et al.*, (2007), a principal via de eliminação de *C. burnetii* em ovinos é através das fezes e das secreções vaginais. Esta constatação destaca que as diferenças nos resultados encontrados na literatura, em comparação com os de nosso estudo, sugerem que não apenas questões relacionadas à distribuição geográfica e ao comportamento dos vetores e do patógeno no ambiente, impactam na detecção, mas também o tipo de amostra utilizadas nos testes afim de garantir uma maior sensibilidade.

No nosso estudo, optamos pela coleta de amostras de sangue total, porém é importante ressaltar que amostras provenientes de fezes, secreções vaginais ou restos de aborto podem proporcionar uma maior probabilidade de detecção nos testes diagnósticos utilizado. Sendo assim, a fim de aumentar a sensibilidade de detecção e conduzir para o aumento dos produtos encontrados na PCR convencional, foi realizada uma PCR Nested. Mares-Guia (2011) constata que a PCR Nested aumenta a sensibilidade e especificidade da PCR para pesquisa de *C. burnetii*. Assim, realizamos o teste seguindo o protocolo de Mares-Guia, confirmando com a PCR Nested, o resultado negativo da primeira PCR convencional.

É essencial registrar que um resultado positivo, especialmente no contexto da análise molecular, acarretaria prejuízos incalculáveis. Isso se deve ao fato de que, alinhado com as medidas adotadas em diversos surtos identificados em rebanhos no mundo, o desfecho recomendado seria a eutanásia dos animais infectados. Por serem animais utilizados na produção (Forneas, 2021).

A divergência nos resultados entre os métodos de diagnóstico utilizados (RIFI e PCR) reflete a fase da infecção nos animais, com a RIFI detectando uma resposta imunológica tardia e quando aguda dependente de soroconversão, já a PCR é mais sensível para detectar a presença ativa do agente (PORTER *et al.*, 2011). É importante ressaltar que a falta de positividade nos testes moleculares realizado nesta população de ovinos estudadas, não exclui a exposição ao patógeno em decorrência presença da reatividade na RIFI, mesmo que baixa para imunoglobulinas de fase tardia (IgG), indicando exposição à bactéria em algum momento. Contudo esse fato não confirma a infecção dos animais (GUIMARÃES *et al.*, 2017).

## **8.2 Ovinos Pantaneiros e *Rickettsia* spp.**

No presente estudo, observou-se que nenhuma das 287 amostras testadas demonstrou reatividade pelo método RIFI e não houve detecção de DNA de *Rickettsia* sp. por PCR. Esta constatação é significativa, especialmente por ser o primeiro estudo sobre *Rickettsia* spp. na população de ovinos pantaneiros no Mato Grosso do Sul, Brasil.

Sabe-se que o DNA bacteriano pode ser detectado no sangue usando PCR duas semanas após a infecção (WEGDAM-BLANS *et al.*, 2012).

É preciso ter cautela na interpretação dos resultados obtidos pela técnica PCR, pois pode ocorrer a diminuição da sensibilidade rapidamente e levar a falsos negativos por apresentarem em quantidades abaixo do limite de detecção (MILLER; PRIESTLEY; KERSH, 2021).

Um estudo conduzido por Guimarães e colaboradores (2017) durante um inquérito sorológico realizado em ovinos no Piauí apresentou resultados similares aos nossos achados. Nesse estudo, nenhum dos 153 ovinos testados pela RIFI demonstrou reatividade para *Rickettsia*. Além disso, 9,8% (15/153) dos ovinos estavam parasitados por carrapatos *Rhipicephalus microplus*, embora essa espécie de carrapato não esteja associada à transmissão do patógeno. No entanto, é importante observar que os carrapatos podem adquirir a infecção pela bactéria, como observado por Sato *et al.*, (2020).

Essa congruência entre os resultados dos estudos reforça a hipótese

de que a ausência de anticorpos contra *R. rickettsii* nas amostras do nosso estudo pode estar relacionada à falta de infestação por carrapatos. Especificamente, nenhum dos animais analisados nesse estudo estava parasitado com carrapatos de qualquer espécie, especialmente do gênero *Amblyomma*, conhecidos como importantes reservatórios da bactéria na natureza.

Em contrapartida, estudos realizados em diferentes partes do mundo sobre a prevalência de *Rickettsia* spp. em ovinos relatam variações significativas. Segundo Nnabuife *et al.*, (2021) relataram uma soroprevalência de 28,8% para *Rickettsias* do grupo da febre maculosa em ovelhas na Nigéria, enquanto Ortuño *et al.*, (2012), na Espanha, determinaram uma reatividade de 15,7% para *Rickettsia slovaca*, uma espécie transmitida por carrapatos *Dermacentor* spp. No Quênia, Maina e colaboradores (2014) encontraram uma soroprevalência de 23% em ovinos e 92,6% de detecção do DNA genômico de *Rickettsia africae* em carrapatos *A. variegatum*, que estavam parasitando os ovinos.

Essa diversidade epidemiológica na prevalência de *Rickettsias* na população de ovinos reflete que diferenças geográficas, práticas de manejo animal e, principalmente, variações climáticas, contribuem para a diversidade e distribuição dos carrapatos encontrados em diferentes regiões (NNABUIFE *et al.*, 2021).

A presença do ectoparasita em animais levanta preocupações quanto à exposição a bactérias transmitidas por esses vetores, como a *Rickettsia*. Embora a epidemiologia das rickettsioses em pequenos ruminantes seja escassa na literatura brasileira, estudos realizados com animais silvestres possibilitam compreender a prevalência de *Rickettsia* na fauna e a possível transmissão aos seres humanos e outros animais, como os ovinos. Farias *et al.* (2021) identificou anticorpos contra *R. Rickettsii* em 5,7% em cavalos analisados e registrou um índice de ectoparasitismo de carrapatos do gênero *A. sculptum* e *Dermacentor nitens* nos mesmos em uma área não endêmica no centro-norte da Bahia. Entre os carrapatos encontrados nestes cavalos, apenas o *A. sculptum* foi relatado como vetor da Febre Maculosa Brasileira. No ciclo de transmissão do patógeno, os cavalos são considerados sentinelas, pois desenvolvem uma resposta imunológica eficaz e persistente, contribuindo

positivamente com a vigilância epidemiológica do patógeno.

Em um estudo realizado por Luz *et al.*, (2019), foram avaliadas as capivaras, que são consideradas o maior reservatório de *R. rickettsii* na natureza e seus carrapatos em duas áreas naturais do bioma Pantanal. Sendo essas, Poconé, Mato Grosso e Corumbá, Mato Grosso do Sul, onde foram encontradas 47% de soropositividade para *Rickettsias* em Corumbá e 100% em Poconé. A espécie do carrapato *A. sculptum* foi abundante parasitando as capivaras em ambas as cidades.

No estudo realizado no Campus Luiz de Queiroz em São Paulo por Ortiz *et al.*, (2018), observou-se uma soroprevalência de 3,22% (1/31) em bovinos, e 6,45% desses bovinos (2/31) estava parasitado por carrapatos, sendo esses *A. sculptum* e *R. Microplus* ambos já esperados por estarem no mesmo ambiente que capivaras e pela especificidade parasitária do *R. microplus* aos bovinos. No mesmo estudo, Ortiz *et al.*, (2018) demonstrou que 1,66% (1/60) dos ovinos apresentaram anticorpos *anti-rickettsia* e 5% (3/60) dos ovinos estavam parasitados por *A. sculptum* (1) e *R. Microplus* (2). A presença destas espécies em ovinos pode ser explicada pelo parasitismo de forma acidental ao compartilharem ambiente com bovinos e capivaras, no entanto isso não ocorreu no estudo. O fato surpreendente pode ser explicado pelo comportamento de emboscada do *A. sculptum* e pela capacidade do deslocamento horizontal do carrapato, visto que capivaras residiam de forma adjacente.

*R. microplus* é conhecido no Brasil pelo parasitismo acidental em ovinos. No entanto, as ovelhas não são consideradas hospedeiros ideais para manutenção desse carrapato na natureza, pois quando parasitando exclusivamente ovinos, os níveis populacionais de *R. microplus* tendem a diminuir a cada geração. A presença desse carrapato nos animais avaliados pode ter ocorrido devido à presença de animais silvestres também parasitados pela espécie, que transitam pelo mesmo ambiente. Apesar de não termos encontrado carrapatos parasitando os ovinos pantaneiros em nosso estudo, há uma problemática relacionada à ampla diversidade de *Rickettsia* na natureza. Como os ovinos são animais de vida livre e compartilham ambientes com outros animais silvestres, que são potenciais hospedeiros da bactéria, e pela capacidade do carrapato-estrela *Amblyomma* de parasitar essa espécie, eles

podem vir a ser expostos a *Rickettsia* spp. Assim, mesmo sem evidências diretas de infestação por carrapatos em nossos resultados, ainda existe o risco de exposição desses ovinos a patógenos transmitidos por esses vetores, o que destaca a importância da vigilância contínua e do entendimento dos fatores que influenciam a dinâmica das doenças transmitidas por carrapatos em populações animais (ORTIZ, 2018).

## 9 CONCLUSÕES

No presente estudo foi confirmada a circulação de *C. burnetii*, pela detecção de anticorpos anti-*C. burnetii* em ovinos pantaneiros e, possibilitou o primeiro inquérito sorológico e molecular no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, em ovinos pantaneiros contribuindo com a vigilância epidemiológica dessas bactérias causadoras de zoonoses, potencialmente fatais.

Diante do exposto, concluímos que os ovinos pantaneiros testados no estudo já foram expostos a bactéria *C. Burnetti* pela detecção de anticorpos por meio do método RIFI , reforçando a necessidade de maior divulgação e conscientização sobre a ocorrência desta zoonose no estado por parte dos órgãos competentes, dos profissionais de saúde e da população em geral para que juntos possam colaborar com medidas de controle e prevenção a essa doença.

A ausência de amplificação de DNA de *C. burnetii* e *Rickettsia* sp na técnica molecular utilizada para ambas as bactérias testadas apontam para a necessidade de mais estudo sobre estas zoonoses e outras doenças infecciosas e parasitárias ainda não estudadas nos rebanhos de ovinos pantaneiros.

Pode-se concluir que até o momento da coleta de sangue dos ovinos, a maioria apresentava escore corporal ECC 2 representando condição corporal magra com evidências de gordura e baixa infestação parasitária. Todos os animais testados eram ausentes de infecção pelos patógenos investigados, no entanto há necessidades de novos estudos para compreender melhor a participação dessas bactérias e dos ovinos no âmbito epidemiológico da Febre Q e Febre Maculosa Brasileira.

## 10 PERSPECTIVAS

- Publicar esses dados em forma de artigo para divulgação do conhecimento para a população.
- Disponibilizar, aos gestores locais, informações sobre a circulação de *C. burnetii*, com ênfase na vigilância epidemiológica e nas medidas de prevenção.
- Dar prosseguimento ao inquérito epidemiológico realizado entre os ovinos nas regiões estudadas e em outras áreas não incluídas neste estudo.
- Enfatizar a necessidade de realizar vigilância contínua do rebanho a fim de prevenir a ocorrência desses patógenos de grande impacto para economia.

## 11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASS, H. et al. High prevalence of *Coxiella burnetii* infection in humans and livestock in Assiut, Egypt: A serological and molecular survey. **Veterinary World**, v. 13, n. 12, p. 2578-2586, dez. 2020.
- ABDAD, M. Y. et al. A Concise Review of the Epidemiology and Diagnostics of Rickettsioses: *Rickettsia* and *Orientia* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 8, p. e01728-17, 26 jul. 2018.
- ABDEL-MOEIN, K. A.; HAMZA, D. A. The burden of *Coxiella burnetii* among aborted dairy animals in Egypt and its public health implications. **Acta Tropica**, v. 166, p. 92-95, 1 fev. 2017.
- ANDERSON, A. et al. Diagnosis and management of Q fever--United States, 2013: recommendations from CDC and the Q Fever Working Group. **MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports**, v. 62, n. RR-03, p. 1-30, 29 mar. 2013.
- ANGELAKIS, E.; RAOULT, D. Q Fever. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 297-309, 27 jan. 2010.
- BARCI, L. A. G. **Febre maculosa brasileira**. Disponível em: <<http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/publicacoes/comunicados-documentos-tecnicos/comunicados-tecnicos/febre-maculosa-brasileira>>. Acesso em: 17 mar. 2024.
- BARON, S. Bacteriology. Em: **Medical Microbiology. 4th edition**. [s.l.] University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
- BIDAISEE, S.; MACPHERSON, C. N. L. Zoonoses and *One Health*: A Review of the Literature. **Journal of Parasitology Research**, v. 2014, p. 874345, 2014.
- BLANTON, L. S. The Rickettsioses: A Practical Update. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 213-229, mar. 2019.
- BORHANI, R. et al. Molecular investigation of *Coxiella burnetii* in aborted fetus of small ruminants in southeast Iran. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, 7 dez. 2023.
- BRASIL. **Situação epidemiológica da Febre Maculosa, Brasil. 2007-2023 – Ministério da Saúde**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/f/febre-maculosa/situacao-epidemiologica/situacao-epidemiologica-da-febre-maculosa-brasil-2007-2023-anexo/view>>. Acesso em: 28 fev. 2024.
- CANÇADO, P. H. D. et al. Host-Parasite Relationship of Ticks (Acari: *Ixodidae* and *Argasidae*) and Feral Pigs (*Sus scrofa*) in the Nhecolândia Region of the Pantanal Wetlands in Mato Grosso do Sul. **ISRN Parasitology**, v. 2013, p. 610262, 19 maio 2013.
- CARDOSO, E. R. N. et al. Susceptibility of *Amblyomma sculptum*, Vector of *Rickettsia rickettsii*, Ticks from a National Park and an Experimental Farm to Different Synthetic Acaricides. **Pathogens**, v. 12, n. 11, p. 1304, 31 out. 2023.

- CDC. **Q fever epidemiology and statistics** | CDC. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/qfever/stats/index.html>>. Acesso em: 18 mar. 2024.
- CELINA, S. S.; CERNÝ, J. *Coxiella burnetii* in ticks, livestock, pets and wildlife: A mini-review. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 1068129, 11 nov. 2022.
- COHEN, R. et al. Spotted Fever Group Rickettsioses in Israel, 2010-2019. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 8, p. 2117-2126, ago. 2021.
- CUMBASSÁ, A. et al. *Coxiella burnetii* DNA detected in domestic ruminants and wildlife from Portugal. **Veterinary Microbiology**, v. 180, n. 1-2, p. 136-141, out. 2015.
- CUNNINGHAM, A. A.; DASZAK, P.; WOOD, J. L. N. *One Health*, emerging infectious diseases and wildlife: two decades of progress? **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 372, n. 1725, p. 20160167, 19 jul. 2017.
- DABAJA, M. F. et al. Occurrence and risk factors of *Coxiella burnetii* in domestic ruminants in Lebanon. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 64, p. 109-116, jun. 2019.
- DAMASCENO, I. A. DE M.; GUERRA, R. C. *Coxiella burnetii* e a febre Q no Brasil, uma questão de saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, p. 4231-4239, dez. 2018.
- DE LEMOS, E. R. S. et al. Q Fever in Military Firefighters during Cadet Training in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 2, p. 303-305, ago. 2018.
- DE OLIVEIRA, J. M. B. et al. *Coxiella burnetii* in dairy goats with a history of reproductive disorders in Brazil. **Acta Tropica**, v. 183, p. 19-22, jul. 2018.
- DE OLIVEIRA, S. V. et al. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 22, n. 1, p. 22, 22 ago. 2016.
- DORKO, E.; RIMÁROVÁ, K.; PILIPCINEC, E. Influence of the environment and occupational exposure on the occurrence of Q fever. **Central European Journal of Public Health**, v. 20, n. 3, p. 208-214, set. 2012.
- DUARTE, P. O. Febre Maculosa Brasileira. 2019.
- ELDIN, C. et al. From Q Fever to *Coxiella burnetii* Infection: a Paradigm Change. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 115-190, jan. 2017.
- ELSOHABY, I.; VILLA, L. Zoonotic diseases: understanding the risks and mitigating the threats. **BMC Veterinary Research**, v. 19, n. 1, p. 186, 3 out. 2023.
- FAGUNDES, N.; LABRUNA, M. B.; UENO, T. **Pesquisa de *Coxiella Burnetii* em propriedades rurais no Estado de São Paulo após surto de febre Q em trabalhadores de um refrigerador - resultados preliminares** | **Estudioso Semântico**. Disponível em: <<https://www.semanticscholar.org/paper/Pesquisa-de-Coxiella-Burnetii-em-propriedades-no-de-Fagundes-Labruna/660300cabb46a657c890623e8cc2cc3521940ab1>>. Acesso em: 29 fev. 2024.

- FARIAS, I. F. et al. Serological evidence of *Rickettsia* in horses from a semi-arid Brazilian region. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, p. e026220, 2 abr. 2021.
- FERNANDES, C. E. DOS S. et al. CARACTERÍSTICAS DO PARTO E INVOLUÇÃO UTERINA EM OVELHAS NATIVAS DO PANTANAL BRASILEIRO. **Ciência Animal Brasileira / Brazilian Animal Science**, v. 14, n. 2, p. 245-252, 27 jun. 2013.
- FERREIRA, E. C. et al. Alternative PCR protocol using a single primer set for assessing DNA quality in several tissues from a large variety of mammalian species living in areas endemic for leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 7, p. 895-898, nov. 2010.
- FERREIRA, M. D. S. Rio de Janeiro Janeiro de 2016. 2016.
- FOURNIER, P.-E.; MARRIE, T. J.; RAOULT, D. Diagnosis of Q Fever. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 7, p. 1823-1834, jul. 1998.
- FRANÇA, D. A. DE et al. *Coxiella burnetii* seroprevalence in sheep herd from Paraguay: First evidence of bacterial circulation in the country. **One Health (Amsterdam, Netherlands)**, v. 18, p. 100660, jun. 2024.
- GALE, P. et al. Q fever through consumption of unpasteurised milk and milk products - a risk profile and exposure assessment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 5, p. 1083-1095, 2015.
- GANGOLIYA, S. R. et al. First molecular and serological evidence of *Coxiella burnetii* infection among sheep and goats of Jammu province of India. **Microbial Pathogenesis**, v. 130, p. 100-103, maio 2019.
- GARCIA, M. V. et al. Environmentally associated ticks (Acari: *Ixodidae*) in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 124-128, mar. 2013.
- GAVA, M. Z. E; BRAGA, F. R.; LANGONI, H. ASPECTOS ETIOEPIDEMIOLÓGICOS DA FEBRE MACULOSA BRASILEIRA: REVISÃO SISTEMÁTICA. **Veterinária e Zootecnia**, v. 29, p. 1-20, 10 out. 2022.
- GUEDES, E. et al. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma* ticks from an area endemic for Brazilian spotted fever in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 4, p. 308-311, 2011.
- GUIMARÃES, M. F. et al. Investigação sorológica de *Rickettsia rickettsii* e *Coxiella burnetii* em caprinos e ovinos no entorno do Parque Nacional da Serra das Confusões, Piauí. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 555-560, jun. 2017.
- 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, set. 1992.
- JUNIOR, F. M. DE V. et al. Avaliação Biométrica de Cordeiro Pantaneiros. **Agrarian**, v. 4, n. 11, p. 60-65, 30 maio 2011.

- KIM, H. K. *Rickettsia*-Host-Tick Interactions: Knowledge Advances and Gaps. **Infection and Immunity**, v. 90, n. 9, p. e0062121, 15 set. 2022.
- KODORI, M. et al. *Coxiella burnetii* Pathogenesis: Emphasizing the Role of the Autophagic Pathway. **Archives of Razi Institute**, v. 78, n. 3, p. 785-796, 30 jun. 2023.
- LABRUNA, M. B. et al. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* Ticks from the State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 6, p. 1073-1081, 1 nov. 2004.
- LABRUNA, M. B. et al. Prevalence of *Rickettsia* Infection in Dogs from the Urban and Rural Areas of Monte Negro Municipality, Western Amazon, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 2, p. 249-255, jun. 2007.
- LABRUNA, M. B. Ecology of *Rickettsia* in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, n. 1, p. 156-166, 2009.
- LANG, G. H. Serosurvey of *Coxiella burnetii* infection in dairy goat herds in Ontario. A comparison of two methods of enzyme-linked immunosorbent assay. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 1, p. 37-41, jan. 1988.
- LAUTENSCHLÄGER, S. et al. Sequencing and Characterization of the Cryptic Plasmid QpRS from *Coxiella burnetii*. **Plasmid**, v. 44, n. 1, p. 85-88, 1 jul. 2000.
- LOH, E. H. et al. Targeting Transmission Pathways for Emerging Zoonotic Disease Surveillance and Control. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 7, p. 432-437, 1 jul. 2015.
- LOTTA, I. A. et al. Disentangling Leucocytozoon parasite diversity in the neotropics: Descriptions of two new species and shortcomings of molecular diagnostics for leucocytozoids. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 9, p. 159-173, 13 maio 2019.
- LUZ, H. R. et al. Epidemiology of capybara-associated Brazilian spotted fever. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 9, p. e0007734, 6 set. 2019.
- MAGOURAS, I. et al. *Coxiella burnetii* Infections in Small Ruminants and Humans in Switzerland. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64, n. 1, p. 204-212, fev. 2017.
- MAINA, A. N. et al. High prevalence of *Rickettsia africae* variants in *Amblyomma variegatum* ticks from domestic mammals in rural western Kenya: implications for human health. **Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 14, n. 10, p. 693-702, out. 2014.
- MARES-GUIA, M. A. M. DE M. Estudo da febre Q em seres humanos, animais domésticos e artrópodes em uma área no Município de Itaboraí, Rio de Janeiro. 2011.
- MARES-GUIA, M. A. M. DE M. et al. Molecular identification of the agent of Q fever - *Coxiella burnetii* - in domestic animals in State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 47, n. 2, p. 231-234, 2014.

MARES-GUIA, M. A. M. M. et al. Molecular Identification of Q Fever in Patients with a Suspected Diagnosis of Dengue in Brazil in 2013-2014. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 5, p. 1090-1094, 4 maio 2016.

MARIANTE, A. et al. Advances in the Brazilian animal genetic resources conservation programme. **Animal Genetic Resources Information**, v. 25, p. 107-121, 1 abr. 1999.

MASALA, G. et al. Occurrence, distribution, and role in abortion of *Coxiella burnetii* in sheep and goats in Sardinia, Italy. **Veterinary Microbiology**, v. 99, n. 3-4, p. 301-305, 19 abr. 2004.

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

MEURER, I. R. PESQUISA DE *Coxiella burnetii*, AGENTE ETIOLÓGICO DA FEBRE Q, EM AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES COM SUSPEITA DE DENGUE NO ESTADO DE MINAS GERAIS, BRASIL: UMA DOENÇA NEGLIGENCIADA. UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE. 2020.

MILLER, H. K.; PRIESTLEY, R. A.; KERSH, G. J. Q Fever: A Troubling Disease and a Challenging Diagnosis. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 43, n. 13, p. 109-118, 1 ago. 2021.

MIONI, M. DE S. R. et al. *Coxiella burnetii* in slaughterhouses in Brazil: A public health concern. **PLoS ONE**, v. 15, n. 10, p. e0241246, 30 out. 2020.

MONTEIRO, M. F. M. DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *RICKETTSIAS* DO GRUPO DA FEBRE MACULOSA EM HUMANOS, ANIMAIS NA INTERFACE SILVESTRE/URBANA E *IXODÍDEOS* PROCEDENTES DO ESTADO DE PERNAMBUCO. UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISILOGIA ANIMAL PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL. 2019.

MUCHON, J. et al. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento para febre maculosa brasileira. **Research, Society and Development**, v. 10, p. e447101623710, 15 dez. 2021.

NAVA, S. et al. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 252-276, 1 abr. 2014.

NNABUIFE, H. E. et al. Seroprevalence of Spotted Fever Group Rickettsiae in extensively managed sheep and goats in Nigeria, West Africa. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, n. 4, p. 425, 2 ago. 2021.

ORTIZ, F. T. Ocorrência de infecção por *Rickettsia rickettsii* em hospedeiros do carrapato-estrela no Campus Luiz de Queiroz. text—[s.l.] Universidade de São Paulo, 20 jul. 2018.

ORTUÑO, A. et al. Evaluation of the Presence of *Rickettsia slovaca* Infection in Domestic Ruminants in Catalonia, Northeastern Spain. **Vector Borne and Zoonotic**

**Diseases**, v. 12, n. 12, p. 1019-1022, dez. 2012.

PACHECO, R. C. et al. *Coxiella burnetii* in ticks, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 2, p. 344-346, fev. 2013.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 719-756, out. 2005.

**(PDF) Maria Mares-guia Mest 2011**. Disponível em:

<<https://dokumen.tips/documents/maria-mares-guia-mest-2011.html>>. Acesso em: 29 fev. 2024.

PEXARA, A.; SOLOMAKOS, N.; GOVARIS, A. Q fever and seroprevalence of *Coxiella burnetii* in domestic ruminants. **Veterinaria Italiana**, v. 54, n. 4, p. 265-279, 31 dez. 2018.

PHILIP, C. B. Observations on Experimental Q Fever. **The Journal of Parasitology**, v. 34, n. 6, p. 457-464, 1948.

PORTER, S. R. et al. Q Fever: current state of knowledge and perspectives of research of a neglected zoonosis. **International Journal of Microbiology**, v. 2011, p. 248418, 2011.

RAHMAN, M. T. et al. Zoonotic Diseases: Etiology, Impact, and Control. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. 1405, 12 set. 2020.

RAOULT, D.; MARRIE, T. Q fever. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 20, n. 3, p. 489-495; quiz 496, mar. 1995.

REIS, F. et al. SISTEMA PRODUTIVO DE OVINOS PANTANEIRO EM ILPF SISTEMA PRODUTIVO DE OVINOS PANTANEIRO EM ILPF SISTEMA PRODUTIVO DE OVINOS PANTANEIRO EM ILPF. 16 jul. 2019.

RICKETTS, H. T. THE TRANSMISSION OF ROCKY MOUNTAIN SPOTTED FEVER BY THE BITE OF THE WOOD-TICK (*DERMACENTOR OCCIDENTALIS*). **Journal of the American Medical Association**, v. XLVII, n. 5, p. 358-358, 4 ago. 1906.

RIEMANN, H. P. et al. Toxoplasma gondii and *Coxiella burnetii* antibodies among Brazilian slaughterhouse employees. **American Journal of Epidemiology**, v. 102, n. 5, p. 386-393, nov. 1975.

ROBINSON, M. T. et al. Diagnosis of spotted fever group *Rickettsia* infections: the Asian perspective. **Epidemiology and Infection**, v. 147, p. e286, 7 out. 2019.

ROCHA, V. J. et al. CAPIVARAS (*Hydrochoerus hydrochaeris*) E A PRESENÇA DO CARRAPATO (*Amblyomma sculptum*) NO CAMPUS DA UFSCAR-ARARAS, SÃO PAULO. **Ciência Animal Brasileira**, v. 18, p. e44671, 4 dez. 2017.

RODOLAKIS, A. et al. Comparison of *Coxiella burnetii* Shedding in Milk of Dairy Bovine, Caprine, and Ovine Herds. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 12, p. 5352-5360, 1 dez. 2007.

- SÁNCHEZ-MONTES, S. et al. Molecular Confirmation of *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma ovale* Ticks, Veracruz, Mexico. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 12, p. 2315-2317, dez. 2019.
- SANTOS, A. S.; BACELLAR, F.; FRANCA, A. Febre Q: Revisão de conceitos. **Medicina Interna**, v. 14, p. 90-99, 1 jan. 2007.
- SARAIVA, C. M. A. Febre Q: uma zoonose subnotificada. maio 2022.
- SATO, T. P. et al. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Rickettsiae* infection in Brazil. **International Journal of Acarology**, v. 46, n. 2, p. 88-93, 17 fev. 2020.
- SOUZA, E. A. R. DE et al. Serological diagnosis and risk factors for *Coxiella burnetii* in goats and sheep in a semi-arid region of Northeastern Brazil. **Revista Brasileira De Parasitologia Veterinária = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology: Orgao Oficial Do Colegio Brasileiro De Parasitologia Veterinaria**, v. 27, n. 4, p. 514-520, 2018.
- SOUZA, E. A. R. D. et al. Q fever and coxiellosis in Brazil: an underestimated disease? A brief review. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 31, n. 3, p. e009822, 2022.
- STEIN, A.; RAOULT, D. Detection of *Coxiella burnetii* by DNA amplification using polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2462-2466, set. 1992.
- SZABÓ, M. P. J.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, p. 27, 12 jul. 2013.
- TISSOT-DUPONT, H. et al. Wind in November, Q Fever in December. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 7, p. 1264-1269, jul. 2004.
- ULLAH, Q. et al. Q Fever—A Neglected Zoonosis. **Microorganisms**, v. 10, n. 8, p. 1530, 28 jul. 2022.
- VALLE, L. A. R. D. et al. INVESTIGAÇÕES SÔBRE A FEBRE Q EM SÃO PAULO. **Arquivos da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo**, v. 9, n. 1-2, p. 167, 1 dez. 1955.
- WALKER, D. H. Rocky Mountain spotted fever: a disease in need of microbiological concern. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 2, n. 3, p. 227-240, jul. 1989.
- WEGDAM-BLANS, M. et al. Evaluation of Commonly Used Serological Tests for Detection of *Coxiella burnetii* Antibodies in Well-Defined Acute and Follow-Up Sera. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 7, p. 1110-1115, jul. 2012.
- WILLEMS, H. et al. Detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk using the polymerase chain reaction (PCR). **Zentralblatt Fur Veterinarmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B**, v. 41, n. 9, p. 580-587, nov. 1994.



## B - Divulgação em Mídias Sociais Sobre *C. burnetii*

# VOCÊ CONHECE A FEBRE Q?

ARRASTE PARA O LADO  
E SAIBA MAIS >>>



Ministério da Saúde  
FUNDEQ  
Fundação Oswaldo Cruz  
Foco em Saúde Animal

# A FEBRE Q

É UMA DOENÇA QUE COMUMENTE AFETA  
ANIMAIS DE PRODUÇÃO COMO OVELHAS,  
CABRAS E GADO CAUSADA PELA BACTÉRIA  
*COXIELLA BURNETII*



Ministério da Saúde  
FUNDEQ  
Fundação Oswaldo Cruz  
Foco em Saúde Animal

# TRANSMISSÃO

**CONTATO DIRETO/INDIRETO**  
PLACENTA CONTAMINADA,  
MATERIAIS DE ABORTO, COUROS  
E LÃS CONTAMINADOS, URINA,  
ESTRUME E SECREÇÕES  
CORPORAIS CONTAMINADAS

**INGESTÃO**  
LEITE E PRODUTOS LÁCTEOS  
CONTAMINADOS, E  
CARNES CONTAMINADAS

**VETORES**  
ENTRE OS ANIMAIS POR  
CARRAPATOS

**INALAÇÃO**  
AERROSSÓIS E  
SOLO CONTAMINADOS



Ministério da Saúde  
FUNDEQ  
Fundação Oswaldo Cruz  
Foco em Saúde Animal

# SINTOMAS



**HUMANO**

- FEBRE
- DOR DE CABEÇA
- NÁUSEA, VÔMITO E DIARREIA
- PERDA DE PESO
- PNEUMONIA
- HEPATITE
- ENCEFALITE
- MIOCARDITE



**ANIMAL**

- PARTO PREMATURO
- ABORTO ESPONTÂNEO
- MORTE FETAL
- METRITE
- ENDOMETRITE
- INFERTILIDADE



Ministério da Saúde  
FUNDEQ  
Fundação Oswaldo Cruz  
Foco em Saúde Animal

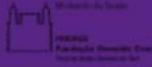
## Tratamento

O TRATAMENTO DA FEBRE Q CONSISTE NO USO DE ANTIBIÓTICOS

**IMPORTANTE** //

PESSOAS DEVEM BUSCAR A ASSISTÊNCIA MÉDICA ASSIM QUE SURTIREM OS PRIMEIROS SINTOMAS.

NO CASO DO ANIMAL PROCURE ORIENTAÇÃO DO VETERINÁRIO.



## Previna-se!

- EDUCAR INDIVÍDUOS DE ALTO RISCO:  
AO ACESSO RESTRITO À ÁREA DE PARTO  
AO DESCARTE ADEQUADO DE PRODUTOS DE PARTO
- EVITAR CONTATO COM ANIMAIS INFECTADOS
- NÃO CONSUMIR LEITE CRU




## FIQUE LIGADO!

TRABALHADORES DE PROCESSAMENTO DE CARNE, TRABALHADORES DE LATICÍNIOS, VETERINÁRIOS, CRIADORES DE GADO E PESQUISADORES

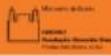
DEVEM TOMAR PRECAUÇÕES EXTRAS AO TRABALHAR COM CABRAS, OVELHAS E GADO



## Gostou?

- ♥ DÊ UM LIKE!
- ▽ COMPARTILHE..
- 🔖 SALVE PARA VER DEPOIS
- 💬 DEIXE SEU COMENTÁRIO

Trabalhamos em parceria com:  
Ministério da Saúde  
FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE  
INSTITUTO DE DEFESA ANIMAL  
Secretaria de Prevenção



## 13 ANEXO

## A - Aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais – CEUA



COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS – CEUA

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Investigação de agentes zoonóticos com ênfase nas *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp., e *Ehrlichia* spp em ovelhas pantaneiras no estado de Mato Grosso do Sul”, registrada com o nº 3119/2020, sob a responsabilidade da pesquisadora Alexsandra Rodrigues de Mendonça Favacho - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrada, para fins de ensino ou desenvolvimento de recurso os didáticos – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Anhanguera-Uniderp, em reunião de 21/10/2020.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/11/2020 a 30/12/2025
Espécie/Linhagem/Raça	Ovinos / Pantaneira
Nº de animais	110
Peso/idade	25 - 30 kg
Sexo	Fêmeas e Machos
Origem	Centro Tecnológico de Ovinocultura da Fundação Manoel de Barros, Fazenda Escola da Universidade Anhanguera-Uniderp

Campo Grande-MS, 21 de outubro de 2020.

  
 Profª Drª Luciana Paes de Andrade  
 Coordenadora da CEUA

  
 Profª Dr. Marcos Barbosa Ferreira  
 Vice Coordenador da CEUA